

# Efeitos Miocárdicos da Endotelina-1 [68]

CARMEN BRÁS-SILVA, ADELINO F. LEITE-MOREIRA

Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2008; 27 (7-8): 925-951

## RESUMO

A endotelina (ET)-1 foi identificada em 1988 como sendo um peptídeo vasoconstrictor produzido pelo endotélio vascular. Sabe-se, actualmente, que a nível cardiovascular a ET-1 pode ser sintetizada não só pelo endotélio (vascular e endocárdico), mas também por células miocárdicas.

A activação dos receptores da ET-1 modula uma grande variedade de processos biológicos incluindo o tono e crescimento vasculares, bem como, a função contráctil miocárdica. Nos mamíferos, os seus efeitos são mediados por dois tipos de receptores, ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>. Os receptores ET<sub>A</sub> promovem vasoconstrição, aumento do inotropismo e mitogénese. Por outro lado, os receptores ET<sub>B</sub> induzem geralmente vasodilatação (mediada pela libertação do óxido nítrico e de prostaciclina), inibição do crescimento e proliferação celular e depuração pulmonar da ET-1 circulante. É possível ainda subdividir os receptores ET<sub>B</sub> em: ET<sub>B1</sub> de localização endotelial e promotores de vasodilatação e efeitos inotrópicos negativos, e em ET<sub>B2</sub> de localização muscular e promotores de vasoconstrição e efeitos inotrópicos positivos.

Vários estudos têm descrito elevados níveis plasmáticos e tecidulares cardíacos de ET-1 na insuficiência cardíaca (IC) e fortes correlações positivas entre os níveis de ET-1, o desenvolvimento de disfunção cardíaca e severidade da IC. Este aspecto fez com que o antagonismo das acções da ET-1 se tornasse num alvo atraente sob o ponto de vista terapêutico, tendo resultado na procura incessante de antagonistas da ET (antagonistas dos receptores e inibidores das enzimas de conversão) pela indústria farmacêutica. O presente artigo constitui uma revisão acerca

## ABSTRACT

### Myocardial Effects of Endothelin-1

Endothelin (ET)-1 was originally identified in 1988 as a vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. It is now known that ET-1 can be produced by vascular and endocardial endothelium and by myocardial cells.

Activation of endothelin receptors modulates a wide variety of biological processes including vascular tone, growth and myocardial contractile function. In mammals, ET-1's effects are mediated through binding to two types of receptors, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>. ET<sub>A</sub> receptor activation elicits vasoconstriction, positive inotropism and mitogenesis, and acutely increases myocardial distensibility. ET<sub>B</sub> receptor stimulation generally promotes vasodilatation, mediated by release of nitric oxide and prostacyclins, growth-inhibitory effects and clearance of ET-1 from the circulation. ET<sub>B</sub> receptors can be further subdivided into ET<sub>B1</sub>, located in endothelial cells and responsible for vasodilatation and negative inotropic effects, and ET<sub>B2</sub>, located in smooth muscle and myocardial cells and responsible for vasoconstriction and positive inotropic effects.

Increased levels of cardiac and circulating ET-1 have been linked to development of cardiac dysfunction and severity of heart failure. This has fueled research into the development of endothelin antagonists (ET receptor and converting enzyme inhibitors) in view of the potential benefits that might derive from their use in clinical practice.

The present review will focus on current understanding of the mechanisms mediating the myocardial actions of ET-1.

dos efeitos miocárdicos da ET-1 e dos mecanismos que lhes estão subjacentes.

**Palavras-Chave**

Endotelina-1; Receptores ET<sub>A</sub>; Receptores ET<sub>B</sub>; Inotropismo; Lusitropismo; Endotélio; Miocárdio; Coração

**Key words**

Endothelin-1; ET<sub>A</sub> receptors; ET<sub>B</sub> receptors; Inotropy; Lusitropy; Endothelium; Myocardium; Heart

## RESENHA HISTÓRICA

O endotélio, vascular e endocárdico, é um importante modulador das funções vascular e miocárdica <sup>(1)</sup>. Esta modulação é mediada pela libertação de várias substâncias, que actuam de forma autócrina e parácrina nas células endoteliais, musculares, ou em outras células adjacentes. Este conceito surgiu na sequência da descoberta do factor relaxante derivado do endotélio por Furchgott e Zawadzki em 1980 <sup>(2)</sup>, que apesar de só ter sido identificado como óxido nítrico (NO) alguns anos mais tarde, originou intensa investigação neste campo, alertando para a importante função do endotélio.

A existência de um peptídeo constritor derivado do endotélio foi proposta, pela primeira vez, em 1985 por Hickey e colaboradores <sup>(3)</sup> e confirmada por Gillespie e colaboradores em 1986 <sup>(4)</sup>. Subsequentemente, Yanagisawa e colaboradores em 1988 isolaram e identificaram a estrutura desta substância contendo 21 aminoácidos, um terminal C hidrofóbico e duas pontes cisteína no terminal N, num meio de cultura de células vasculares endoteliais <sup>(5)</sup>. A descoberta deste potente vasoconstritor, então denominado endotelina (ET) <sup>(5)</sup>, despertou grande interesse na comunidade científica mundial. A demonstrá-lo estão os milhares de artigos publicados até à data sobre o sistema da ET.

A análise posterior de sequências genómicas humanas revelou a existência de três genes distintos para a ET, codificadores de três isopeptídeos designados de ET-1, ET-2 e ET-3 <sup>(6,7)</sup> (Figura 1). Cada um destes isopeptídeos é expresso em diferentes células e tecidos. A isoforma predominante no sistema cardiovascular humano é a ET-1, que corresponde à ET inicialmente identificada por Yanagisawa e colaboradores. Uma quarta isoforma, originalmente identificada no Ratinho como constritor intestinal vasoactivo, é um análogo da ET-2 humana e específico daquela espécie animal <sup>(8,9)</sup>.

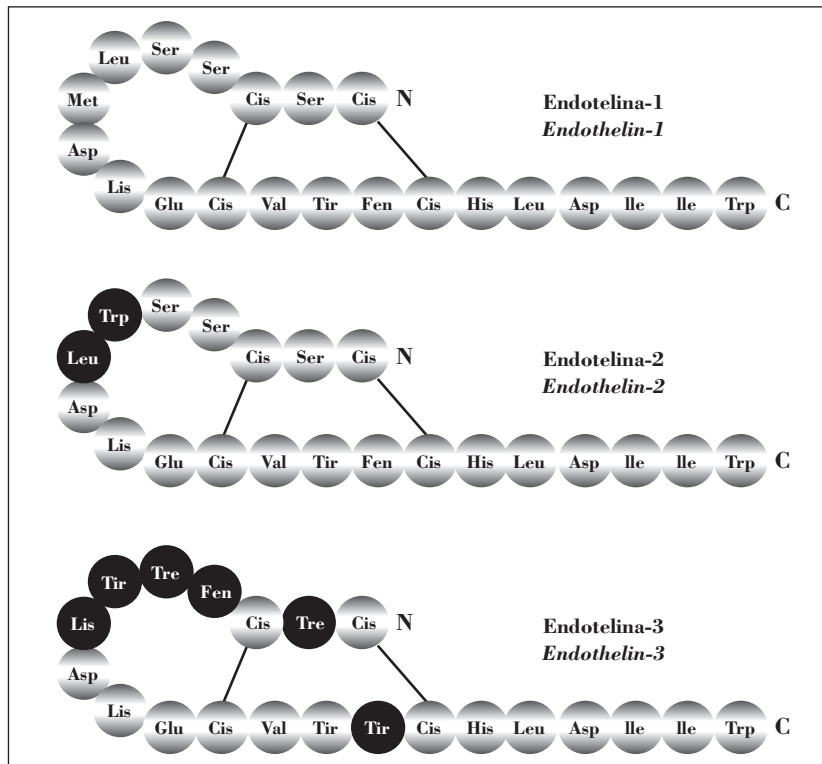
## HISTORICAL OVERVIEW

Vascular and endocardial endothelium is an important modulator of vascular and myocardial function <sup>(1)</sup>. This modulation is mediated by the release of various substances with autocrine and paracrine action in endothelial, muscle or other adjacent cells. This concept was first put forward following the discovery of endothelium-derived relaxing factor by Furchgott and Zawadzki in 1980 <sup>(2)</sup>; although this was identified as nitric oxide (NO) only some years later, it stimulated research in this field and revealed the important function of the endothelium.

The existence of an endothelium-derived vasoconstrictor peptide was first suggested in 1985 by Hickey et al. <sup>(3)</sup> and confirmed by Gillespie et al. in 1986 <sup>(4)</sup>. Subsequently, in 1988, Yanagisawa et al. isolated the peptide in cultured vascular endothelial cells and showed that its structure consisted of 21 amino acids, a hydrophobic C-terminal and two cysteine residues at the N-terminal <sup>(5)</sup>. The discovery of this potent vasoconstrictor, which was named endothelin (ET) <sup>(5)</sup>, aroused considerable interest in the international scientific community and thousands of articles have been published on the ET system.

Subsequent analysis of human genomic sequences revealed the existence of three separate ET genes, coding for three isopeptides, designated ET-1, ET-2 and ET-3 <sup>(6,7)</sup> (Figure 1). Each of these isopeptides is expressed in different cells and tissues. The predominant isoform in the human cardiovascular system is ET-1, which is the one first identified by Yanagisawa et al. A fourth isoform, originally identified in the mouse as a vasoactive intestinal constrictor, is an analogue of human ET-2 and specific to mice <sup>(8,9)</sup>.

In 1990, two receptors for ET were cloned: ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> <sup>(10,11)</sup>. They both belong to the family



**Figura 1.** Estrutura das isoformas da endotelina. Os resíduos a preto correspondem aos que diferem da endotelina-1 (Adaptado de<sup>(32)</sup>).

**Figure 1.** Structure of the endothelin isoforms. The residues shown in black are those that differ from endothelin-1 (adapted from<sup>(32)</sup>).

Em 1990, foram clonados dois receptores com afinidade específica para as ETs: os receptores ET<sub>A</sub> e os receptores ET<sub>B</sub><sup>(10,11)</sup>. Ambos pertencem à família dos receptores transmembranares associados a proteínas G, mas enquanto que o receptor ET<sub>A</sub> se liga à ET-1 e à ET-2 com maior afinidade do que à ET-3, o receptor ET<sub>B</sub> liga-se às três isoformas com igual afinidade. O efeito vasoconstritor intenso e sustentado induzido pela ET-1 e o seu consequente envolvimento na progressão de doenças cardiovasculares fez com que as ETs fossem conotadas como “*the bad guys of circulatory control*”<sup>(12)</sup> e se tornassem num alvo atraente sob o ponto de vista terapêutico. Estes aspectos e a necessidade crescente de melhor conhecer as acções fisiopatológicas destes agentes, foram determinantes para a procura incessante de antagonistas dos receptores da ET pela indústria farmacêutica, de tal forma que, logo em 1992, surgiu o primeiro antagonista dos receptores ET<sub>A</sub>, o BQ-123<sup>(13)</sup>. Pesquisas subsequentes originaram inúmeros antagonistas selectivos e não-selectivos para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, alguns dos quais têm sido usados em estudos pré-clínicos e em ensaios clínicos. É contudo de salientar o desenvolvimento dos primeiros antagonistas não-selectivos eficientes por administração oral, o Ro46-2005 e o Ro47-

of G-protein-coupled receptors, but while the ET<sub>A</sub> receptor binds to ET-1 and ET-2 with higher affinity than to ET-3, the ET<sub>B</sub> receptor binds equally to all three isoforms. The potent, sustained vasoconstrictor effect of ET-1, and hence its role in progression of cardiovascular disease, meant that ETs came to be regarded as “the bad guys of circulatory control”<sup>(12)</sup> and were thus an attractive therapeutic target. This, together with the growing need for a better understanding of the pathophysiological action of these agents, led to a determined search by the pharmaceutical industry for ET receptor antagonists, and the first ET<sub>B</sub> receptor antagonist, BQ-123, appeared in 1992<sup>(13)</sup>. Subsequent research produced various selective and nonselective ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor antagonists, some of which have reached the stage of pre-clinical studies and clinical trials. The first efficacious orally-active nonselective antagonists to be developed were Ro46-2005 and Ro47-0203 (bosentan)<sup>(14, 15)</sup>, the latter being the first ET receptor antagonist to be approved by the US Food and Drug Administration for therapeutic use in humans, for the treatment of pulmonary hypertension.

Identification of the main enzymes responsible for ET synthesis from its precursor,

0203 (bosentan)<sup>(14,15)</sup>, sendo que este último foi também o primeiro antagonista dos receptores da ET a ser aprovado pela *Food and Drug Administration* para uso terapêutico em humanos, neste caso, para o tratamento de hipertensão arterial pulmonar.

A identificação das principais enzimas responsáveis pela síntese de ET a partir do seu precursor, designadas enzimas de conversão da ET (ECE)-1 e 2<sup>(16-19)</sup>, constituiu igualmente um marco importante na história da ET. O sistema da ET ganhava assim novos constituintes, as várias isoformas de peptidases activadoras, a acrescentar aos três isopeptídeos ET e aos dois receptores associados a múltiplas vias de sinalização intracelular.

## ASPECTOS MOLECULARES DO SISTEMA DAS ENDOTELINAS

### Síntese e Secreção de Endotelina

O produto inicial do gene da ET é a pré-pró-ET, um peptídeo de 212 aminoácidos que é convertido por uma protease semelhante à furina em *big* ET, de 38 aminoácidos. Esta, por sua vez, é processada em ET pelas enzimas de conversão da ET, ECE-1, ECE-2 e ECE-3, cada uma delas com diversas isoformas. As ECEs pertencem à família das metaloproteases e localizam-se nas células endoteliais, células do músculo liso, cardiomiócitos e macrófagos. O significado da existência de múltiplas isoformas de ECEs permanece por esclarecer, mas poderá estar relacionado com a distribuição distinta em diferentes compartimentos da mesma célula ou em diferentes tipos de células. Estas enzimas não são, no entanto, as únicas promotoras da síntese de ET, outras vias alternativas incluem metaloproteases distintas das ECEs (como a endopeptidase neutra) e a quimase que cliva a *big* ET num peptídeo de 31 aminoácidos, a ET1-31. Esta parece ser posteriormente convertida em ET pela endopeptidase neutra<sup>(20-22)</sup> (*Figura 2*).

A ET-1 é secretada pelas células endoteliais através de duas vias: uma via constitutiva e uma via regulada<sup>(22,23)</sup>. Assim, se por um lado, a ET-1 é continuamente transportada e libertada por vesículas secretoras, via que é modulada ao nível da síntese proteica e que é responsável pela libertação basal de ET-1, por outro, ela pode

termed endothelin-converting enzymes (ECEs) -1 and -2<sup>(16-19)</sup>, was also an important landmark in the history of ET. The ET system thus acquired new constituents, the various isoforms of the activating peptidases, in addition to the three ET isopeptides and the two receptors that are linked to multiple intracellular signaling pathways.

## MOLECULAR FEATURES OF THE ENDOTHELIN SYSTEM

### Synthesis and secretion of endothelin

The initial product of the ET gene is preproendothelin (prepro-ET), a 212-amino acid peptide, which is converted by a furin-like protease into big ET, with 38 amino acids. This in turn is synthesized into ET by the endothelin-converting enzymes ECE-1, ECE-2 and ECE-3, each of which has various isoforms. ECEs belong to the metalloprotease family and are found in endothelial and smooth muscle cells, cardiomyocytes and macrophages. The significance of the existence of multiple ECE isoforms is still unknown, but it may be related to their distribution in different compartments of the same cell or in different types of cell. These enzymes are not, however, the only promoters of ET synthesis; alternative pathways include other metalloproteases different from ECE (such as neutral endopeptidase), and chymase, which cleaves big ET into ET1-31, a 31-amino acid peptide. The latter then appears to be converted to ET by neutral endopeptidase<sup>(20-22)</sup> (*Figure 2*).

ET-1 is secreted by endothelial cells through two pathways, one constitutive and one regulated<sup>(22,23)</sup>. Thus, while ET-1 is continuously transported and released by secretory vesicles, a pathway that is modulated by protein synthesis and is responsible for basal release of ET-1, it can also be secreted from the granules (Weibel-Palade bodies) where it is stored, in response to physiological or pathophysiological stimuli.

The synthesis and release of ET-1 is stimulated by various physical and chemical factors, including low shear stress, hypoxia, acidity, and the action of angiotensin II, vasopressin, thrombin, growth factors and cytokines. On the other hand, it is inhibited by NO, natriuretic peptides, prostacyclins, heparin and increased blood flow, the latter due to increased NO release by activation of shear stress

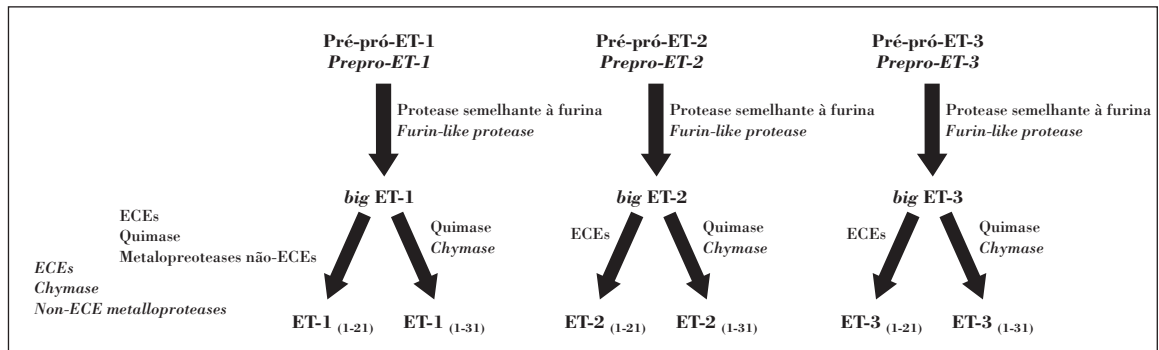


Figura 2. Síntese de endotelina. ECEs: enzimas de conversão da endotelina (Adaptado de <sup>(20)</sup>).

Figure 2. Endothelin synthesis (adapted from <sup>(20)</sup>). ECEs: endothelin-converting enzymes

ser também secretada a partir de grânulos específicos (corpos de Weibel-Palade) onde se encontra armazenada, em resposta a estímulos fisiológicos e fisiopatológicos externos.

A síntese/libertação de ET-1 é estimulada por vários factores físicos e químicos incluindo: baixos níveis de *shear* stress, hipóxia, acidez, angiotensina II, vasopressina, trombina, factores de crescimento e citocinas. Pelo contrário, a produção de ET-1 é inibida pelo NO, peptídeos natriuréticos, prostaciclina, heparina e aumento do fluxo sanguíneo, este último através do aumento da libertação de NO por activação dos receptores de *shear* stress nas células endoteliais <sup>(24)</sup>. A secreção de ET-1 activa é assim controlada por regulação quer ao nível da transcrição genética, quer ao nível da actividade das enzimas conversoras. A maioria dos factores estimuladores actuam através da activação da fosfolipase C (PLC) e consequentemente da proteína cinase C (PKC), ou através de vias dependentes de proteínas cinases activadas por mitogénios (MAPKs), enquanto que os factores inibitórios são mediados pela inibição do metabolismo do bifosfato de fosfatidilinositol induzida pela via do monofosfato de guanósina cíclico (GMPc) <sup>(24,25)</sup>.

A ET-1 é um componente normal do plasma humano que está constantemente a ser produzida e removida. Em indivíduos saudáveis, as concentrações de ET-1 são muito baixas, variando na maioria dos estudos entre cerca de 0,3 pg/mL a 3 pg/mL (0,15-1,5 pM) <sup>(26)</sup>. É geralmente aceite que os níveis de ET-1 são bastante superiores junto às células musculares lisas do que no lúmen vascular, devido à sua libertação predominantemente *abluminal* <sup>(27)</sup>.

receptores in endothelial cells <sup>(24)</sup>. Secretion of active ET-1 is thus regulated at both the genetic transcription level and at the level of converting enzyme activity. Most stimulating factors activate phospholipase C (PLC) and consequently protein kinase C (PKC), or the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, while inhibiting factors inhibit the metabolism of phosphatidylinositol biphosphate induced by the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway <sup>(24,25)</sup>.

ET-1 is a normal component of human plasma and is being constantly produced and removed. In healthy individuals, ET-1 concentrations are very low, ranging between 0.3 and 3 pg/ml (0.15-1.5 pM) in most studies <sup>(26)</sup>. It is generally accepted that ET-1 levels are considerably higher in smooth muscle cells than in the vascular lumen, due to its predominantly *abluminal* release <sup>(27)</sup>. Brunner <sup>(28)</sup>, however, demonstrated in isolated rat heart that baseline levels of ET-1 secreted into the lumen of coronary vessels are five times higher than those released into interstitial fluid, although the resulting concentrations are greater in the interstitial space than in the lumen. The authors attribute these seemingly paradoxical differences to the rapid dilution of ET-1 in the coronary circulation.

### Endothelin receptors

In mammals, the effects of ET-1 are mediated by binding to two types of receptors: ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>. Other types of receptor have been identified in amphibians <sup>(29)</sup> and birds <sup>(30)</sup> but there is no molecular evidence to date of their presence in mammals <sup>(31)</sup>.

Brunner <sup>(28)</sup> demonstrou, porém, em corações isolados de Rato, que as quantidades basais de ET-1 secretadas para o lúmen vascular são cinco vezes superiores às lançadas para o fluido intersticial, embora a concentração resultante seja maior no espaço intersticial do que no lúmen dos vasos coronários. Os autores atribuíram estas diferenças, aparentemente paradoxais, à rápida diluição da ET-1 na circulação coronária.

### Receptores da Endotelina

Nos mamíferos, os efeitos da ET-1 são mediados pela ligação a dois tipos de receptores: os receptores ET<sub>A</sub> e os receptores ET<sub>B</sub>. Tipos de receptores adicionais foram identificados apenas em anfíbios <sup>(29)</sup> e em aves <sup>(30)</sup>, não existindo, contudo, até à data evidências moleculares da sua existência em mamíferos <sup>(31)</sup>.

No Homem, os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> são codificados por genes localizados nos cromossomas 4q28 e 13q22, respectivamente, partilham cerca de 60% de identidade em aminoácidos <sup>(32)</sup> e cada um dos tipos é altamente preservado nas várias espécies de mamíferos. Ambos os receptores contêm sete domínios transmembranares e pertencem à classe I (família A ou *rhodopsin-like*), da família de receptores transmembranares associados a proteínas G <sup>(31)</sup>. Estes receptores utilizam um complexo conjunto de moléculas sinalizadoras, que depende do tipo de receptor e do ligando em questão <sup>(33)</sup>.

Os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> distinguem-se não só pela sua afinidade de ligação às diferentes isoformas de ET (*vide supra*), mas também pela sua distribuição nos tecidos e células e pelos seus efeitos fisiológicos. Assim, no sistema cardiovascular, os receptores ET<sub>A</sub> são expressos nas células musculares lisas, nos cardiomiócitos e nos fibroblastos, e os receptores ET<sub>B</sub> são expressos predominantemente nas células endoteliais e em menor grau no músculo liso, nos fibroblastos e nos cardiomiócitos. Em termos gerais, os receptores ET<sub>A</sub>, mais abundantes no sistema cardiovascular, promovem vasoconstrição, aumento do inotropismo e mitogénese <sup>(34)</sup>. Por outro lado, os receptores ET<sub>B</sub> têm propriedades vasodilatadoras, mediadas pela libertação de NO <sup>(35)</sup> e prostaciclina <sup>(36)</sup>, e efeitos inibitórios do crescimento associados a apoptose <sup>(37,38)</sup>. Este tipo de receptores é também responsável pela depuração pulmonar da ET-1

In humans, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors are coded by genes located on chromosomes 4q28 and 13q22 respectively and share around 60% of their amino acids <sup>(32)</sup>; both types are highly conserved in mammals. They both contain seven transmembrane domains and belong to class I (family A or *rhodopsin-like*) G-protein-coupled receptors <sup>(31)</sup>. They use a complex series of signaling molecules, which are ligand- and receptor-type specific <sup>(33)</sup>.

ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors are distinguished not only by binding to different ET isoforms (see above), but also by their distribution in tissues and cells and their physiological effects. In the cardiovascular system, ET<sub>A</sub> receptors are expressed in smooth muscle cells, cardiomyocytes and fibroblasts, while ET<sub>B</sub> receptors are predominantly found in endothelial cells and to a lesser extent in smooth muscle, fibroblasts and cardiomyocytes. In general, ET<sub>A</sub> receptors are more abundant in the cardiovascular system, where they cause vasoconstriction and increase inotropism and mitogenesis <sup>(34)</sup>, while ET<sub>B</sub> receptors have vasodilatory effects, mediated by the release of NO <sup>(35)</sup> and prostacyclins <sup>(36)</sup>, and growth inhibitory properties related to apoptosis <sup>(37, 38)</sup>. The latter receptor is also responsible for pulmonary clearance of circulating ET-1 <sup>(39, 40)</sup> and its re-uptake by endothelial cells <sup>(41)</sup>.

At the vascular level, the two types of receptor can be further divided. ET<sub>A</sub> receptors, found in muscle cells, can be subdivided into ET<sub>A1</sub> and ET<sub>A2</sub> depending on whether or not they are sensitive to the BQ-123 antagonist <sup>(42)</sup>. ET<sub>B</sub> receptors are classified as ET<sub>B1</sub> in endothelial cells and responsible for vasodilation, and as ET<sub>B2</sub> in muscle cells and responsible for vasoconstriction <sup>(43)</sup>. Similarly, in the heart, ET<sub>B</sub> receptors in endothelial cells (ET<sub>B1</sub>) are responsible for negative inotropic and lusitropic effects, while those in the myocardium (ET<sub>B2</sub>) have positive inotropic and lusitropic action <sup>(44)</sup>.

Various interactions between ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors have also been described <sup>(45-51)</sup>, with the existence of ET<sub>A</sub>-ET<sub>B</sub> heterodimers being suggested as a possible explanation. It has been demonstrated that ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors form constitutive heterodimers and homodimers in transfected cells <sup>(52, 53)</sup>. ET<sub>B</sub> receptors appear to be internalized more slowly when in the form of



circulante<sup>(39,40)</sup> e pela sua recaptação pelas células endoteliais<sup>(41)</sup>.

A nível vascular é possível ainda subdividir estes dois tipos de receptores. Os receptores ET<sub>A</sub>, de localização muscular, podem ser classificados em ET<sub>A1</sub> e ET<sub>A2</sub> consoante são ou não sensíveis ao antagonista BQ-123, respectivamente<sup>(42)</sup>. Por seu turno, os receptores ET<sub>B</sub> podem ser classificados em ET<sub>B1</sub> de localização endotelial e promotores de vasodilatação e em ET<sub>B2</sub> de localização muscular e promotores de vasoconstrição<sup>(43)</sup>. De forma similar, a nível cardíaco os receptores ET<sub>B</sub> podem ser de localização endotelial (ET<sub>B1</sub>) e responsáveis por efeitos inotrópicos e lusitrópicos negativos e de localização miocárdica (ET<sub>B2</sub>) responsáveis por inotropismo e lusitropismo positivos<sup>(44)</sup>.

Foram também descritas várias interações dos receptores ET<sub>A</sub> com os ET<sub>B</sub><sup>(45-51)</sup>. A existência de heterodímeros ET<sub>A</sub>-ET<sub>B</sub> foi apontada como possível explicação. Foi demonstrado, recentemente, que em células transfectadas os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> formam constitutivamente heterodímeros e homodímeros<sup>(52,53)</sup>. Os receptores ET<sub>B</sub> parecem ser internalizados mais lentamente quando presentes sob a forma de heterodímeros ET<sub>A</sub>-ET<sub>B</sub>. Além disso, estes heterodímeros só se dissociam após longa exposição a agonistas selectivos para os receptores ET<sub>B</sub>, contrariamente aos homodímeros, que parecem ser resistentes à dissociação induzida por ligandos<sup>(52,53)</sup>. Desconhece-se até que ponto a dimerização dos receptores da ET ocorre em células naturais e pode afectar a actividade biológica deste peptídeo.

### Depuração e Inactivação da Endotelina

Vários mecanismos actuam em conjunto de forma a degradar e a inactivar a ET-1, resultando numa eficaz remoção deste peptídeo da circulação. Estes processos determinam a sua curta semivida plasmática (inferior a 2 minutos) e têm lugar sobretudo nos pulmões, mas também nos rins, fígado e coração<sup>(54-56)</sup>. O importante papel dos receptores ET<sub>B</sub> na remoção da ET-1 da circulação, descrita pela primeira vez por Fukuroda e colaboradores<sup>(39)</sup>, está agora claramente estabelecida e é a principal responsável pela manutenção de baixas concentrações plasmáticas<sup>(40)</sup>.

A endopeptidase neutra tem sido apontada como sendo a enzima potencialmente implicada

ET<sub>A</sub>-ET<sub>B</sub> heterodimers. Furthermore, these heterodimers only become dissociated after prolonged exposure to selective ET<sub>B</sub> receptor antagonism, unlike homodimers, which appear to be resistant to ligand-induced dissociation<sup>(52,53)</sup>. It is not known to what extent dimerization of ET receptors occurs in natural cells and how it may affect the peptide's biological activity.

### Endothelin clearance and inactivation

Various mechanisms act in conjunction in ET-1 clearance and inactivation. These processes explain its short plasma half-life (less than two minutes) and take place mainly in the lungs, but also in the kidneys, the liver and the heart<sup>(54-56)</sup>. The important role of ET<sub>B</sub> receptors in clearance of circulating ET-1, first described by Fukuroda et al.<sup>(39)</sup>, is now firmly established; they are mainly responsible for maintaining low plasma concentrations<sup>(40)</sup>.

It has been suggested that neutral endopeptidase may be involved in hydrolysis of ET-1<sup>(57,58)</sup>.

Various studies have been published in recent years that set out to characterize intracellular trafficking of ET receptors, with the aim of clarifying the mechanisms of receptor desensitization. The ligand-occupied ET<sub>B</sub> receptor is internalized and targeted to lysosomes, where the receptor-ligand complex is degraded, while the ET<sub>A</sub> receptor is targeted to endosomes and recycled<sup>(59-61)</sup>. The rapid recycling of ET<sub>A</sub> receptors may be related to their sustained vascular effects; by contrast, the lysosomal destination of ET<sub>B</sub> receptors is consistent with their role in clearance of circulating ET-1. However, some authors have found that ET<sub>B</sub> receptors bind to caveolin and suggest that this causes them to be retained in caveolae and slows their internalization<sup>(62)</sup>. Such interpretations and extrapolation of the pathophysiological implications should be treated with caution, since these studies were performed in artificial cell cultures<sup>(63)</sup>.

### VASCULAR EFFECTS OF ENDOTHELIN-1

Various studies in different animal species have demonstrated that exogenous administration of ET-1 induces a biphasic vascular response: a transient fall in blood pressure followed by

na degradação da ET-1<sup>(57,58)</sup>.

Nos últimos anos têm surgido alguns estudos que visam caracterizar o tráfico intracelular dos receptores da ET, no sentido de esclarecer possíveis mecanismos de dessensibilização dos receptores. O receptor ET<sub>B</sub> quando ocupado pelo ligando é internalizado e dirigido para os lisossomas, onde o complexo receptor-ligando é degradado, enquanto que o receptor ET<sub>A</sub> é dirigido para os endossomas e reciclado<sup>(59-61)</sup>. A rápida reciclagem dos receptores ET<sub>A</sub> poderá estar relacionada com os efeitos vasculares sustentados a que estão associados; pelo contrário, o destino lisossômico dos receptores ET<sub>B</sub> é consistente com o seu papel na depuração de ET-1 da circulação. Não obstante, alguns autores verificaram que os receptores ET<sub>B</sub> se ligam à caveolina e sugerem que esta ligação poderá assegurar a sua localização caveolar e evitar a sua rápida internalização<sup>(62)</sup>. Estas interpretações e a extrapolação de implicações fisiopatológicas devem contudo ser prudentes, uma vez que estes estudos foram realizados em culturas celulares artificiais<sup>(63)</sup>.

### Efeitos Vasculares da Endotelina-1

Inúmeros estudos demonstraram, em diversas espécies animais, que a administração exógena de ET-1 induz uma resposta vascular bifásica que se inicia por uma redução transitória da pressão arterial, à qual se segue uma fase hipertensiva sustentada<sup>(64)</sup>. Está actualmente bem definido que a fase depressora envolve um endotélio funcionante e uma resposta fisiológica à estimulação dos receptores ET<sub>B1</sub> endoteliais, enquanto que a vasoconstrição resultante da fase hipertensiva é mediada pelos receptores ET<sub>A</sub><sup>(24)</sup>. Este efeito bifásico é também dependente da concentração de ET-1, a qual em concentrações baixas induz vasodilatação e em concentrações mais elevadas (superiores a 4 pM, no Rato) induz vasoconstrição<sup>(24, 28)</sup>.

Os receptores da ET são extensivamente expressos na vasculatura, aspecto que é consistente com o papel fisiológico ubiqüitário da ET na homeostasia vascular. Os receptores ET<sub>A</sub> são os principais responsáveis pelo efeito vasoconstritor arterial. Nos vasos pulmonares<sup>(65-67)</sup> os receptores ET<sub>B</sub> estão presentes em maior número do que nas artérias de outros leitos vasculares e exercem também efeitos vasoconstritores. Os receptores ET<sub>B</sub> localizados

sustained hypertension<sup>(64)</sup>. It is now established that the depressor effect involves normally functioning endothelium and is a physiological response to stimulation of endothelial ET<sub>B1</sub> receptors, while the vasoconstriction in the hypertensive phase is mediated by ET<sub>A</sub> receptors<sup>(24)</sup>. This biphasic effect is also dependent on ET-1 levels: low concentrations induce vasodilation, while higher concentrations (over 4 pM in the rat) cause vasoconstriction<sup>(24, 28)</sup>.

ET receptors are widely expressed in the vasculature, which is consistent with the ubiquitous physiological role of ET in vascular homeostasis. ET<sub>A</sub> receptors are mainly responsible for the arterial vasoconstrictor effect. ET<sub>B</sub> receptors are found in greater numbers in pulmonary vessels<sup>(65-67)</sup> than in other vascular beds, and also cause vasoconstriction. ET<sub>B</sub> receptors in endothelial cells have vasodilator effects triggered by release of NO<sup>(35)</sup> and prostacyclins<sup>(36)</sup>. The expression of ET<sub>B</sub> receptors in coronary artery endothelium is low<sup>(68)</sup>, and thus ET-1 acts principally as a coronary vasoconstrictor<sup>(69)</sup>. However, ET-1 has arterial vasodilator effects in most other vascular beds and in physiological conditions, as demonstrated by various studies using ET receptor antagonists and transgenic animal models<sup>(24)</sup>.

Various interactions have been described in recent years between ET-1 and other regulators of vascular function. It is known, for example, that ET-1 increases NO release through stimulation of endothelial ET<sub>B1</sub> receptors and that in turn NO inhibits production of ET-1 by endothelial cells<sup>(70, 71)</sup>. Besides NO, several other mediators can block ET-1-induced vasoconstriction, either directly or indirectly (by reducing production) including prostaglandins<sup>(36)</sup>, adrenomedullin<sup>(72)</sup>, relaxin<sup>(73)</sup>, atrial natriuretic peptide, ghrelin<sup>(74)</sup>, and endothelium-derived hyperpolarizing factor<sup>(75)</sup>. Curiously, all these vascular relaxing factors, except relaxin, are secreted in response to stimulation of endothelial ET<sub>B1</sub> receptors. Moreover, ET-1 levels are controlled and maintained at vasodilatory concentrations by the continuous clearance process mentioned previously.

ET-1 also increases the activity of other vasoactive substances such as angiotensin II<sup>(76)</sup>, norepinephrine and serotonin<sup>(77)</sup>, promotes the synthesis and secretion of thrombospondin and fibronectin<sup>(78)</sup>, modifies the expression of



nas células endoteliais exercem efeitos vasodilatadores dependentes da libertação de NO<sup>(35)</sup> e de prostaciclina<sup>(36)</sup>. Nas artérias coronárias a expressão de receptores ET<sub>B</sub> a nível endotelial é reduzida<sup>(68)</sup>, pelo que a ET-1 actua principalmente como vasoconstritor coronário<sup>(69)</sup>. Na maior parte dos outros leitos vasculares e em condições fisiológicas a ET-1 tem, contudo, efeitos vasodilatadores arteriais como é evidenciado por diversos estudos usando antagonistas dos receptores da ET e modelos animais transgénicos<sup>(24)</sup>.

Nos últimos anos foram descritas várias interacções da ET-1 com outros reguladores da função vascular. Sabe-se, por exemplo, que a ET-1 aumenta a libertação de NO através da estimulação dos receptores ET<sub>B1</sub> endoteliais e que, por outro lado, o NO inibe a produção de ET-1 pelas células endoteliais<sup>(70,71)</sup>. Além do NO, diversos outros mediadores podem antagonizar directa ou indirectamente (pela redução da produção) a vasoconstricção induzida pela ET-1, incluindo as prostaglandinas<sup>(36)</sup>, a adrenomedulina<sup>(72)</sup>, a relaxina<sup>(73)</sup>, a grelina, o peptídeo natriurético auricular<sup>(74)</sup> e o factor hiperpolarizante derivado do endotélio<sup>(75)</sup>. Curiosamente, todos estes relaxantes vasculares, com excepção da relaxina, são secretados em resposta à estimulação dos receptores ET<sub>B1</sub> endoteliais. Além disso, os níveis de ET-1 são controlados e mantidos em concentrações vasodilatadoras pelo processo de depuração contínua, como mencionado acima.

A ET-1 pode também aumentar a actividade de outras substâncias vasoactivas, tais como a angiotensina II<sup>(76)</sup>, a noradrenalina e a serotonina<sup>(77)</sup>, promover a síntese e a secreção de trombospondina e fibronectina<sup>(78)</sup>, modificar as proteínas da matriz extracelular dos tecidos cardiovasculares<sup>(79,80)</sup> e aumentar a adesão de plaquetas e de neutrófilos<sup>(81)</sup>. Para além de induzir proliferação das células musculares lisas<sup>(79)</sup>, a ET-1 estimula a actividade de factores de crescimento<sup>(82,83)</sup> funcionando também como um agente co-mitogénico.

Em suma, a contribuição global da ET-1 para a regulação do tono vascular resulta de efeitos mediados pelos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> nas células musculares lisas e dos efeitos mediados pelos receptores ET<sub>B</sub> no endotélio. Logo, a expressão e/ou actividade, bem como a redução da integridade das vias dependentes dos receptores

extracellular matrix proteins in cardiovascular tissue<sup>(79,80)</sup>, and enhances platelet and neutrophil adhesion<sup>(81)</sup>. Besides stimulating proliferation of smooth muscle cells<sup>(79)</sup>, ET-1 stimulates the activity of growth factors<sup>(82,83)</sup> and acts as a co-mitogenic agent.

To summarize, the overall contribution of ET-1 to the regulation of vascular tone results from effects mediated by ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors in smooth muscle cells and by ET<sub>B</sub> receptors in the endothelium. Thus, changes in its expression and/or activity, as well as reduced integrity of ET<sub>B</sub> receptor-dependent pathways, may contribute to endothelial dysfunction and hence play a part in the pathogenesis of cardiovascular diseases such as hypertension and heart failure (HF). In such conditions, the dysregulation of ET-1 levels, and of other neurohumoral agents it interacts with, causes an imbalance that favors its proliferative and constrictor effects.

ET-1-induced vasoconstriction is mediated by activation of various intracellular signaling pathways, including: (a) activation of PLC by G-protein, which leads to hydrolysis of phosphatidylinositol biphosphate and generation of inositol triphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG); (b) higher concentrations of calcium ions (Ca<sup>2+</sup>) through increased uptake and mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup>; (c) activation of PKC; (d) changes in intracellular pH (alkalinization) through activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger; (e) activation of phospholipase A2 and arachidonic acid metabolism; (f) phospholipase D activation; (g) generation of superoxide free radicals; and (h) production of cyclic nucleotides<sup>(84)</sup>. The effects of ET-1 on vascular growth and remodeling involve activation of various kinases, particularly MAPK<sup>(84)</sup>.

## MYOCARDIAL EFFECTS OF ENDOTHELIN-1

The active peptide ET-1 is found in the heart, together with its precursors, ECEs, and its receptors, collectively known as the endothelin system. The actions of the ET system are multiple and include modulation of systolic and diastolic function, fetal heart development and ventricular remodeling in progressive heart failure.

ET<sub>B</sub>, podem contribuir para disfunção endotelial e assim participar na patogénese de doenças cardiovasculares, tais como, a hipertensão e a insuficiência cardíaca. Adicionalmente, nestas situações patológicas a desregulação dos níveis de ET-1, bem como de outros agentes neuro-humorais com os quais esta interage, promove um desequilíbrio que favorece os seus efeitos proliferativos e constritores.

A vasoconstrição induzida pela ET-1 é mediada pela activação de várias vias de sinalização intracelular, incluindo: (a) a activação da PLC pela proteína G, que conduz à hidrólise do bifosfato de fosfatidilinositol e acumulação de trifosfato de inositol (IP3) e de diacilglicerol (DAG); (b) o aumento da concentração de iões cálcio (Ca<sup>2+</sup>), pelo aumento da entrada e da mobilização do Ca<sup>2+</sup> intracelular; (c) a activação da PKC; (d) alterações do pH intracelular (alcalinização) por estimulação do trocador sódio/hidrogénio (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>); (e) a activação da fosfolipase A2 e do metabolismo do ácido araquidónico; (f) a activação da fosfolipase D; (g) a geração de radicais livres superóxido; e (h) a produção de nucleotídeos cíclicos<sup>(84)</sup>. Os efeitos da ET-1 no crescimento e remodelagem vascular envolvem a activação de diversas cinases, sobretudo de MAPKs<sup>(84)</sup>.

## EFEITOS MIOCÁRDICOS DA ENDOTELINA-1

No coração é possível encontrar o peptídeo activo ET-1, os seus precursores, as ECEs, e os seus receptores (colectivamente denominados “sistema da endotelina”). Os efeitos do sistema da ET-1 são múltiplos e incluem acções na modulação das funções sistólica e diastólica, no desenvolvimento fetal do coração e na remodelagem ventricular na progressão para a insuficiência cardíaca (IC).

### Efeitos na Função Sistólica

A ET-1 promove um efeito inotrópico positivo que, embora de magnitude variável, é visível na maioria dos mamíferos incluindo o Rato, a Cobaia, o Coelho<sup>(85,86)</sup>, o Furão<sup>(87)</sup> e o Homem<sup>(86,88)</sup>. Contudo, uma vez que a ET-1 induz potencialmente vasoconstrição coronária, este efeito sobre a contractilidade miocárdica poderá não ser aparente, ou até constituir um efeito

## Effects on systolic function

ET-1 has a positive inotropic effect of varying magnitude in most mammals, including rats, guinea-pigs, rabbits<sup>(85, 86)</sup>, ferrets<sup>(87)</sup>, and humans<sup>(86, 88)</sup>. However, since ET-1 can induce coronary vasoconstriction, its effect on myocardial contractility may not be apparent, or it may even have a negative inotropic action, as seen in perfused isolated heart preparations and in vivo studies<sup>(89)</sup>. In the human heart, the strength of ET-1's positive inotropic effect varies in different cardiac chambers and pathological states<sup>(88, 90)</sup>. The physiological role of endogenous ET-1 in regulating contractile function appears to depend on levels of the peptide in the vicinity of myocytes and on the modulating influence of other myocardial and vasoactive factors released by vascular and/or endocardial endothelium. In healthy humans, ET receptor blockade reduces contractility, as shown by reduction in the rate of left ventricular pressure development, which suggests that endogenous ET-1 has a positive inotropic effect<sup>(91)</sup>.

Nevertheless, ET-1 has been shown to depress myocardial contractility in certain preparations and experimental conditions. High concentrations of exogenous ET-1 (1 to 300 nM) in mouse ventricular trabeculae had a negative inotropic effect, by reducing the amplitude of intracellular calcium transients<sup>(92)</sup>. In isolated rabbit right atria and dog ventricular trabeculae, pre-stimulated with isoprenaline, there was a marked reduction in active tension in response to moderate concentrations of ET-1 (1 to 10 nM), mediated by ET<sub>A</sub> receptors<sup>(93)</sup>. The same group subsequently documented the effects of ET-1 on contractile function by crosstalk between ET-1 and endogenous norepinephrine. Tissue concentrations of this agent determined the direction of ET-1's myocardial action, through activation of different concentration-dependent signaling pathways<sup>(94)</sup>. This highlights the importance of interactions between different neurohumoral signals in modulating cardiac function.

## Types of endothelin receptor involved in inotropic effects

The positive inotropic response is usually attributed to stimulation of ET<sub>A</sub> receptors, since the ET-1 isoform is predominant in the cardiovascular system and has been shown to

inotrópico negativo como o verificado em preparações de perfusão de coração isolado ou em estudos *in vivo* <sup>(89)</sup>. No coração humano, a magnitude do efeito inotrópico positivo da ET-1 varia com a câmara cardíaca e com o estado patológico <sup>(88,90)</sup>. O papel fisiológico da ET-1 endógena na regulação da função contráctil parece depender dos níveis do peptídeo que estão presentes na vizinhança dos miócitos e de influências moduladoras de outros factores miocárdicos ou vasoactivos, libertados pelo endotélio vascular e/ou endocárdico. Em humanos saudáveis, o bloqueio dos receptores da ET promove uma diminuição da contractilidade, evidente pela redução na velocidade de desenvolvimento da pressão ventricular esquerda e sugerindo um efeito inotrópico positivo para a ET-1 endógena <sup>(91)</sup>.

Não obstante, a ET-1 pode deprimir a contractilidade miocárdica em certas preparações e condições experimentais. Em trabéculas ventriculares de Ratinho, concentrações elevadas de ET-1 (1 a 300 nM) administrada exogenamente induziram um efeito inotrópico negativo, através da redução da amplitude dos transientes de cálcio intracelular <sup>(92)</sup>. Em trabéculas isoladas da aurícula direita de Coelho e do ventrículo de Cão, pré-estimuladas com isoprenalina, verificou-se uma redução pronunciada da tensão activa em resposta a concentrações moderadas de ET-1 (1 a 10 nM) e mediada pelos receptores ET<sub>A</sub> <sup>(93)</sup>. Posteriormente, autores do mesmo grupo documentaram efeitos contrácteis antagónicos da ET-1, dependentes da interacção com a noradrenalina endógena. A concentração tecidual deste agente determinava a direcção da acção miocárdica da ET-1, através da activação de diferentes vias sinalizadoras dependentes da concentração <sup>(94)</sup>. Este aspecto aponta para a importância de potenciais interacções de diferentes sinais neuro-humorais na modulação da função cardíaca.

### **Tipo de Receptores da Endotelina Envolvidos no Efeito Inotrópico**

A resposta inotrópica positiva é habitualmente atribuída à estimulação dos receptores ET<sub>A</sub>, uma vez que a ET-1 é a isoforma predominante no sistema cardiovascular e mostrou ser um inotrópico mais potente do que a ET-3 na maioria das preparações experimentais. Este conceito está em concordância com estudos

be a more potent inotropic agent than ET-3 in most experimental preparations. This is in agreement with autoradiographic studies and studies of receptor expression showing that cardiomyocytes predominantly or almost exclusively express ET<sub>A</sub> receptors (85-90% of receptors in human atrial and ventricular myocytes) <sup>(95)</sup>. In myocytes isolated from rabbit myocardium, a positive effect on cell shortening was also associated with ET<sub>A</sub> receptors <sup>(96)</sup>. In some species and in particular myocardial preparations such as rabbit papillary muscle, ET-1 and ET-3 induce similar contractile effects, suggesting that these may be mediated by ET<sub>B</sub> receptors <sup>(85)</sup>. Indeed, some authors have argued that ET<sub>B</sub> receptors play a major role in mediating the positive inotropic effect induced by ET-1 in the rat <sup>(97, 98)</sup>. In mice, it has been observed that ET<sub>B</sub> receptor antagonism enhances contractile response to increases in preload, while ET<sub>A</sub> or combined ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor antagonism attenuates this response, indicating that in this species the increased contractile force mediated by ET<sub>A</sub> receptors is suppressed by stimulation of ET<sub>B</sub> receptors <sup>(99)</sup>. The cardiostimulatory effects of ET-1 in human right atrium are generally attributed to ET<sub>A</sub> receptors <sup>(88)</sup>. Some authors even consider that the receptors found in human cardiomyocytes and responsible for ET-1 activity at this level are functionally distinct from known receptors and term them “non-ET<sub>A</sub>, non-ET<sub>B</sub> receptors” <sup>(100)</sup>.

Recent studies have provided functional evidence for the existence of two subtypes of ET<sub>B</sub> receptors in the heart: ET<sub>B1</sub>, in endocardial endothelium, that have negative inotropic and lusitropic effects; and ET<sub>B2</sub>, in the myocardium, that induce positive inotropy and lusitropy <sup>(44)</sup>. The varying myocardial response to selective stimulation of ET<sub>B</sub> receptors according to the functional integrity of the endocardial endothelium, bearing in mind that different receptor subtypes are involved in these circumstances, indicates that this response could be used to assess endothelial integrity. Indeed, an impaired response to selective ET<sub>B1</sub> receptor stimulation in an experimental model of HF confirmed the value of this response as a marker and quantifier of endocardial endothelial dysfunction and demonstrated its occurrence in HF <sup>(101)</sup>.

To summarize, despite different findings due

de autorradiografia e de expressão de receptores que demonstraram que os cardiomiócitos expressam predominantemente, ou quase exclusivamente, receptores  $ET_A$  (cerca de 85-90% dos receptores nos miócitos auriculares e ventriculares humanos)<sup>(95)</sup>. Em miócitos isolados de coração de Coelho, o efeito positivo no encurtamento celular foi também associado aos receptores  $ET_A$ <sup>(96)</sup>. Em algumas espécies e em determinadas preparações miocárdicas, tais como músculos papilares de Coelho, a ET-1 e a ET-3 induzem efeitos contrácteis semelhantes, sugerindo que estes podem igualmente ser mediados pelos receptores  $ET_B$ <sup>(85)</sup>. De facto, alguns autores descreveram um papel preponderante dos receptores  $ET_B$  na mediação do efeito inotrópico positivo induzido pela ET-1 no Rato<sup>(97,98)</sup>. No Ratinho, observou-se que o antagonismo dos receptores  $ET_B$  aumentou a resposta contráctil a aumentos da pré-carga, enquanto o antagonismo dos receptores  $ET_A$  ou misto  $ET_A/ET_B$  atenuou esta resposta, indicando que, nesta espécie animal, o aumento da força contráctil mediado pelos receptores  $ET_A$  é suprimido pela estimulação dos receptores  $ET_B$ <sup>(99)</sup>. Na aurícula direita humana, os efeitos cardioestimuladores da ET-1 são geralmente atribuídos aos receptores  $ET_A$ <sup>(88)</sup>. Outros autores consideram ainda que os receptores presentes no cardiomiócitos humanos e responsáveis pela actividade da ET-1 a este nível são funcionalmente distintos dos conhecidos e portanto designados de receptores “não-A, não-B”<sup>(100)</sup>.

Estudos recentes forneceram evidências funcionais para a existência de dois subtipos de receptores  $ET_B$  a nível cardíaco: os  $ET_{B1}$  de localização endotelial endocárdica e promotores de inotropismo e lusitropismo negativo e os  $ET_{B2}$  de localização miocárdica e indutores de inotropismo e lusitropismo positivo<sup>(44)</sup>. A resposta miocárdica distinta à estimulação selectiva dos receptores  $ET_B$ , dependente da integridade funcional do EE, tendo em conta os diferentes subtipos de receptores estimulados nestas circunstâncias, indica que a sua utilização poderá funcionar como teste para avaliar a integridade do EE. Efectivamente, a atenuação da resposta à estimulação selectiva dos receptores  $ET_{B1}$  num modelo experimental de IC, comprovou a relevância da utilização desta resposta como marcador e quantificador de disfunção endotelial

to the use of different experimental preparations and animal species, the evidence to date supports the idea that the myocardial receptors involved in regulating systolic function are predominantly of the  $ET_A$  type, although  $ET_B$  receptors also appear to be physiologically important.

### **Molecular mechanisms involved in inotropic effects**

The inotropic effects of ET-1 are mediated by various intracellular signaling pathways<sup>(102)</sup> (Figure 3).

As with other neurohormones, ET-1 acts by regulating the movement and intracellular concentrations of ions and thus affects the contractile properties of cardiomyocytes. Binding of ET-1 to  $ET_A$  receptors in the cardiomyocyte cell membrane stimulates hydrolysis of phosphatidylinositol biphosphate to DAG and IP<sub>3</sub>. The central mechanism involved in the ET-1 response of force generation (positive inotropism) is activation of one or more PLC isoforms, with or without concomitant activation of L-type voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels. In the latter case,  $Ca^{2+}$  transport can also be due to stimulation of the  $Na^+/H^+$  exchanger, resulting in intracellular accumulation of  $Na^+$ , which can reverse the normal direction of the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger and thus increase intracellular concentrations of  $Ca^{2+}$ . Stimulating the cardiac  $Na^+/H^+$  exchanger also leads to intracellular alkalization by around 0.1 pH units and sensitization of contractile proteins to  $Ca^{2+}$ <sup>(24)</sup>. The positive inotropic effect triggered by ET-1 in rat ventricular myocytes was initially attributed to increased sensitization of myofilaments to  $Ca^{2+}$ <sup>(103)</sup>, and subsequently, as being also associated with a higher amplitude of intracellular  $Ca^{2+}$  transients, corresponding to the  $Ca^{2+}$  available for contraction<sup>(104)</sup>. ET-1 activates the PLC pathway in the rabbit<sup>(96)</sup>, and in the guinea-pig it causes a series of effects, including increased transmembrane  $Ca^{2+}$  flux through L-type  $Ca^{2+}$  channels and stimulation of the  $Na^+/H^+$  exchanger following PKC activation<sup>(105)</sup>. Finally, formation of IP<sub>3</sub> and changes in the myofibrillar response to  $Ca^{2+}$  have been observed in association with the positive inotropic effect of ET-1 in human left ventricle<sup>(90,106)</sup>.

The two main mechanisms involved in mediation of the occasional negative inotropic action of ET-1 are alterations in transmembrane currents and reduced cell levels of cyclic



endocárdica e demonstrou a ocorrência desta disfunção na IC<sup>(101)</sup>.

Resumindo, e apesar dos diferentes achados resultantes da utilização de preparações experimentais e de espécies animais distintas, as evidências existentes até à data sustentam o conceito de que os receptores miocárdicos envolvidos no controlo da função sistólica pertencem predominantemente ao tipo ET<sub>A</sub>, embora os receptores ET<sub>B</sub> se afigurem também como fisiologicamente relevantes.

### Mecanismos Moleculares Envolvidos no Efeito Inotrópico

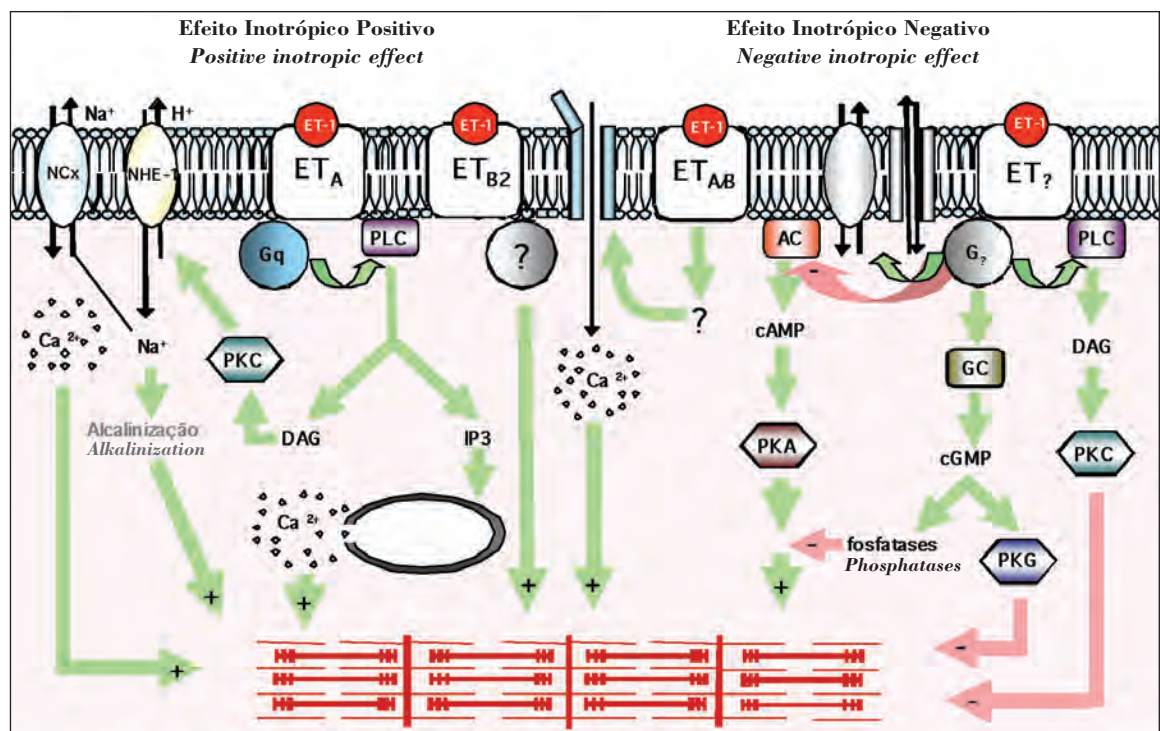
Os efeitos inotrópicos da ET-1 são mediados por várias vias de sinalização intracelulares<sup>(102)</sup> (Figura 3).

Tal como outras neuro-hormonas, a ET-1 afecta as propriedades contrácteis do cardiomiócito pela regulação do movimento e concentração intracelular de iões. A ligação da ET-1 aos receptores ET<sub>A</sub> na membrana celular do cardiomiócito estimula a hidrólise do bifosfato

adenosine monophosphate (cAMP). The transient negative inotropic effect observed in human atria following exogenous administration of ET-1 has been attributed to inhibition of adenylate cyclase<sup>(107)</sup>. The sustained negative inotropic effect of ET-1 found in rabbit atria after pre-stimulation with isoprenaline was also accompanied by lower cAMP levels. On the other hand, no changes in levels of this messenger associated with reduced contractile force induced by activation of ET<sub>A</sub> receptors were detected in the dog<sup>(93)</sup>. The negative inotropism induced by selective endothelial ET<sub>B1</sub> receptor stimulation has been shown to be mediated by the release of NO and prostaglandins<sup>(44)</sup>.

### Effects on heart rate

Experimental studies of the action of ET-1 on heart rate have reported both positive and negative chronotropic effects, or no effect at all. These results may be partly explained by the reduced myocardial perfusion resulting from coronary artery constriction in in vivo



**Figura 3.** Mecanismos de transdução de sinal que estão envolvidos nos efeitos inotrópicos da ET-1. NCx: trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>; NHE-1: trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; PLC: fosfolipase C; PKA: proteína cinase A; PKC: proteína cinase C; PKG: proteína cinase G; AC: adenilciclase; GC: guanilciclase; DAG: diacilglicerol; IP3: trifosfato de inositol.

**Figure 3.** Signal transduction mechanisms involved in the inotropic effects of ET-1. NCx: Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger; NHE-1: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger; PLC: phospholipase C; PKA: protein kinase A; PKC: protein kinase C; PKG: protein kinase G; AC: adenylcyclase; GC: guanylcyclase; DAG: diacylglycerol; IP3: inositol triphosphate; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; cGMP: cyclic guanosine monophosphate.



de fosfatidilinositol em DAG e IP3. O mecanismo central envolvido na resposta da ET-1 para geração de força (inotropismo positivo) é a activação de uma ou várias isoformas de PLC, com ou sem activação concomitante dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L dependentes de voltagem. No último caso, os movimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  podem também ser devidos à estimulação do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , causando acumulação intracelular de  $\text{Na}^+$  que potencialmente reverte a direcção normal do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e assim aumenta a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . A estimulação do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cardíaco conduz também à alcalinização intracelular em cerca de 0,1 unidades de pH e à sensibilização das proteínas contrácteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>(24)</sup>. O efeito inotrópico positivo desencadeado pela ET-1 em miócitos ventriculares de Rato foi inicialmente atribuído ao aumento da sensibilização dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>(103)</sup>, e posteriormente, associado também a uma elevação da amplitude dos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, correspondentes ao  $\text{Ca}^{2+}$  disponível para a contracção <sup>(104)</sup>. No Coelho sabe-se que a ET-1 activa a via da PLC <sup>(96)</sup> e na Cobaia promove uma combinação de mecanismos incluindo o aumento do fluxo transmembranar de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L e a estimulação do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  consequente à activação da PKC <sup>(105)</sup>. Finalmente, a formação do IP3 e as alterações da resposta miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$  foram observadas em associação com o efeito inotrópico positivo da ET-1 no ventrículo esquerdo humano <sup>(90,106)</sup>.

Os dois principais mecanismos implicados na mediação das acções inotrópicas negativas ocasionais da ET-1 são alterações das correntes transmembranares e reduções dos níveis celulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O efeito inotrópico negativo transitório observado nas aurículas humanas após administração exógena de ET-1 foi atribuído à inibição da adenilciclase <sup>(107)</sup>. O efeito inotrópico negativo sustentado da ET-1, verificado após pré-estimulação com isoprenalina nas aurículas de Coelho, foi igualmente acompanhado por diminuição dos níveis de AMPc. Por outro lado, não foram identificadas alterações dos níveis deste mensageiro associadas à redução da força contráctil induzida pela activação dos receptores  $\text{ET}_A$  no Cão <sup>(93)</sup>. No que concerne ao efeito inotrópico negativo induzido pela estimulação selectiva dos receptores  $\text{ET}_{B1}$  endoteliais foi

experimental preparations or in isolated heart preparations, and by the use of supraphysiological concentrations of ET-1 <sup>(24)</sup>.

Studies using ET receptor antagonists or lower concentrations of the peptide may help to clarify the situation. In rats subjected to coronary artery occlusion, ET receptor antagonists had antiarrhythmic properties post-ischemia, showing that the release of endogenous ET-1 during myocardial ischemia is arrhythmogenic <sup>(108, 109)</sup>. Similarly, the incidence of post-ischemic tachyarrhythmias was reduced by  $\text{ET}_A$  receptor blockade during ischemia in ex vivo perfused rat hearts <sup>(110)</sup>. By contrast, electrophysiological studies in rabbit <sup>(111)</sup> and guinea-pig <sup>(112)</sup> sinus node cells showed that ET-1 administered exogenously induces membrane hyperpolarization and shortens action potential duration, leading to decreased cardiac excitability. This effect appears to involve inhibition of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and chloride ion currents, as well as activation of potassium ion currents <sup>(113)</sup>. ET-1-induced suppression of cardiac excitability may help prevent harmful rises in heart rate, as in situations of increased sympathetic stimulation such as in myocardial ischemia <sup>(114)</sup>.

To summarize, the role of endogenous ET-1 in regulating heart rate and rhythm in vivo, particularly in humans, remains to be determined.

### Endothelin and myocardial response to preload

In 1973, Parmley and Chuck observed that increasing the length and/or passive tension of cat papillary muscle in vitro was followed by both rapid and slow increases in shortening and muscle tension <sup>(115)</sup> (*Figure 4A*). The immediate change in shortening and muscle tension is the basis of the Frank-Starling mechanism and is due in large part to increased sensitivity of myofilaments to  $\text{Ca}^{2+}$ . On the other hand, the slow response, which occurs during the 10 to 15 minutes following muscle stretch, involves the action of ET and  $\text{Ca}^{2+}$  as a result of a complex autocrine/paracrine mechanism <sup>(116)</sup>. Specifically, myocardial stretch triggers release of angiotensin II, which leads to the formation and/or release of ET (probably ET-3), which in turn activates the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. Stimulation of this exchanger causes concentrations of intracellular  $\text{Na}^+$  to rise,

demonstrado que é mediado pela libertação de NO e de prostaglandinas<sup>(44)</sup>.

### Efeitos na Frequência Cardíaca

Nos trabalhos experimentais relativos à acção da ET-1 sobre a frequência cardíaca, foram descritos tanto efeitos cronotrópicos positivos como negativos e até a inexistência de quaisquer efeitos. Estes resultados poderão ser explicados, pelo menos em parte, pela limitação da perfusão miocárdica derivada da constrição coronária em preparações experimentais *in vivo* ou em preparações de coração isolado e pela utilização de concentrações suprafisiológicas de ET-1<sup>(24)</sup>.

Alguns estudos que usaram antagonistas dos receptores da ET ou concentrações mais baixas deste peptídeo podem ajudar a esclarecer este aspecto. Em ratos sujeitos a oclusão da artéria coronária, antagonistas dos receptores da ET têm propriedades antiarrítmicas em situações de pós-isquemia, mostrando que a ET-1 libertada endogenamente durante a isquemia miocárdica é arritmogénica<sup>(108,109)</sup>. De igual forma, a incidência de taquiarritmias pós-isquemia foi reduzida pelo bloqueio dos receptores ET<sub>A</sub> durante a isquemia em corações de Rato perfundidos *ex vivo*<sup>(110)</sup>. Pelo contrário, estudos electrofisiológicos em células do nó sinusal de Coelho<sup>(111)</sup> e Cobaia<sup>(112)</sup> mostraram que a ET-1 administrada exogenamente induz hiperpolarização da membrana e encurtamento da duração do potencial de acção, conducentes à supressão da excitabilidade cardíaca. Esta acção parece envolver a inibição dos canais de Ca<sup>2+</sup> de tipo L e correntes de iões cloreto, bem como a activação de correntes de iões potássio<sup>(113)</sup>. Esta supressão da excitabilidade cardíaca induzida pela ET-1 poderá evitar aumentos nefastos da frequência cardíaca, tais como os que ocorrem em situações de aumento da estimulação simpática, por exemplo, na isquemia miocárdica<sup>(114)</sup>.

Em conclusão, o papel da ET-1 endógena na regulação da frequência e ritmo cardíacos *in vivo*, particularmente no Homem, permanece ainda por definir.

### Endotelina e Resposta Miocárdica à Pré-carga

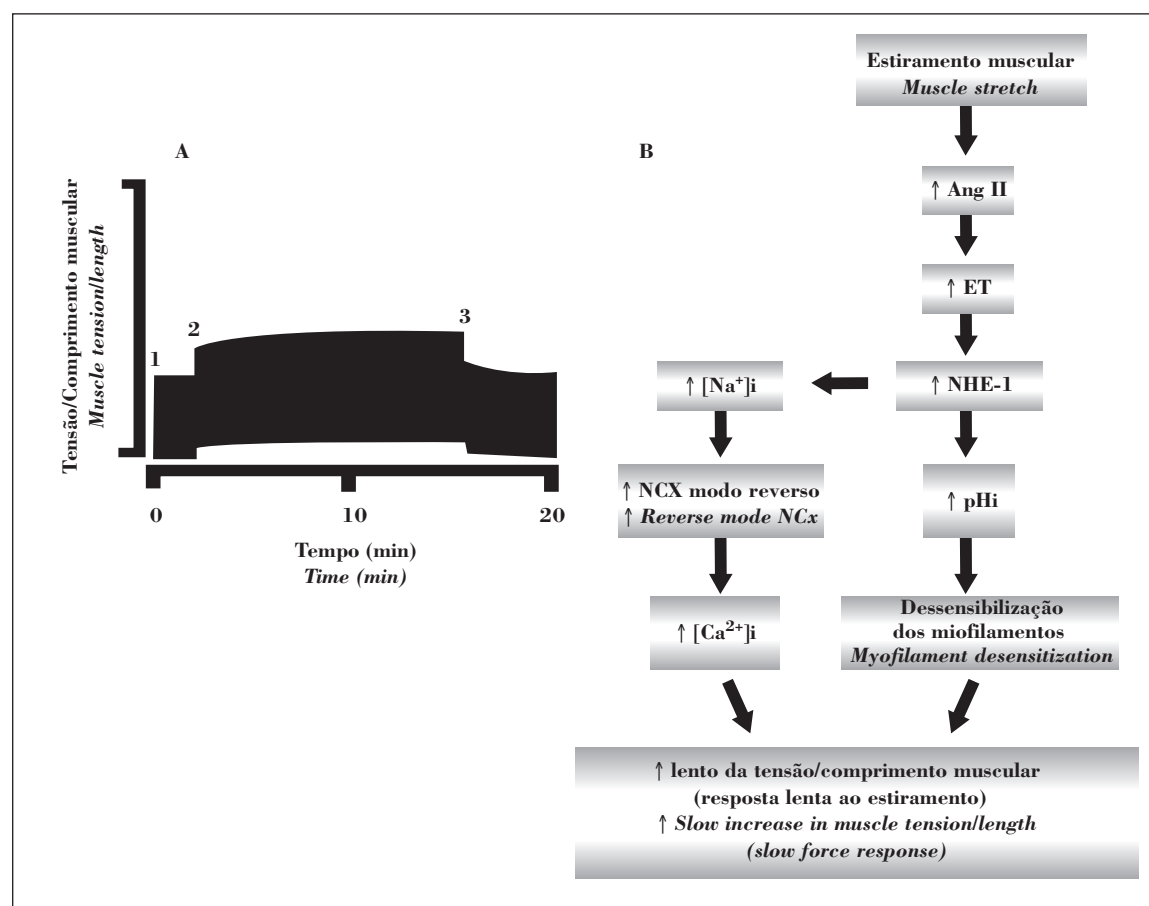
Em 1973, Parmley e Chuck observaram que ao aumento do comprimento e/ou da tensão passiva de músculos papilares de Gato, estudados *in vitro*, se seguiam aumentos quer

followed by activation of the reverse mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange, leading to increased uptake of Ca<sup>2+</sup> and hence increased myocardial contractility. The greater sensitivity of myofilaments to Ca<sup>2+</sup> caused by the intracellular alkalization resulting from activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger is a complementary pathway of the slow force response to myocardial stretch<sup>(116-118)</sup> (Figure 4B). Piuhola et al.<sup>(119)</sup> tested the contribution of ET-1 to the Frank-Starling mechanism in the intact hearts of healthy and hypertensive rats with myocardial hypertrophy. Both healthy and hypertrophied hearts had a preserved Frank-Starling response (increase in contractile function in response to increased preload / end-diastolic pressure); however, while ET receptor blockade had no visible effect in healthy hearts, it significantly weakened the response in hypertrophied hearts. These results suggest that endogenous ET-1 contributes to the response to increased preload in the presence of myocardial hypertrophy.

### Effects on diastolic function

The determinants of diastolic function include myocardial relaxation and the passive properties of the ventricular wall, such as wall stiffness and thickness and chamber geometry (size and volume). Other factors include the structures surrounding the ventricle, the left atrium, the pulmonary veins and the mitral valve, as well as heart rate. Myocardial stiffness is determined by the intrinsic properties of the cardiomyocytes themselves (the cytoskeleton) and the extracellular matrix<sup>(120-122)</sup>. Thus, an analysis of the effects of ET-1 on diastolic function must take into account its effect on both myocardial relaxation (lusitropic effects) and stiffness.

As regards myocardial relaxation, exogenous administration of ET-1 in isolated muscle preparations resulted in increased rate of tension decline and muscle re-extension (myocardial relaxation)<sup>(123)</sup>. In the intact heart, the effects of ET-1 result from the direct action of the peptide and indirect effects triggered by coronary and/or systemic vasoconstriction. Although moderate coronary vasoconstriction does not significantly affect cardiac function, the more severe vasoconstriction induced by high, non-physiological, ET-1 levels results in myocardial ischemia<sup>(124, 125)</sup>. In this case, relaxation velocity tends to decrease due to lack of energy supply. On the other hand,



**Figura 4.** (A) Resposta miocárdica ao estiramento (elevação da pré-carga). O estiramento de um músculo papilar a contrair isotónica ou isometricamente, resulta numa resposta bifásica: um aumento rápido inicial (1-2), seguido por um aumento adicional progressivo da tensão activa ou do encurtamento muscular (2-3).

(B) Mecanismos de transdução de sinal associados à resposta lenta ao estiramento. Ang II: angiotensina II; ET: endotelina; NHE-1: trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>: concentração intracelular de Na<sup>+</sup>; NCX: trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: concentração intracelular de iões cálcio; pHi: pH intracelular (Adaptado de <sup>(116)</sup>).

**Figure 4.** (A) Myocardial response to stretch (elevation of preload). Papillary muscle stretch during isotonic or isometric contraction results in a biphasic response: an initial rapid increase (1-2), followed by a gradual further increase in active tension or muscle shortening (2-3); (B) Signal transduction mechanisms associated with the slow force response (adapted from <sup>(116)</sup>).

Ang II: angiotensin II; ET: endothelin; NHE-1: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger; [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>: intracellular Na<sup>+</sup> concentration; NCx: Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration; pHi: intracellular pH

rápidos quer lentos do encurtamento e da tensão muscular desenvolvidos <sup>(115)</sup> (*Figura 4A*). A alteração imediata do encurtamento/tensão muscular constitui actualmente a base da lei de Frank-Starling e é devida em grande parte ao aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca<sup>2+</sup>. Por outro lado, a resposta lenta, que ocorre ao longo dos 10 a 15 minutos que sucedem o estiramento muscular, envolve a acção da ET e do Ca<sup>2+</sup> como resultado de um complexo mecanismo autócrino e parácrino <sup>(116)</sup>. Mais detalhadamente, o estiramento miocárdico provoca a libertação de angiotensina II, que, por sua vez, conduz à formação e/ou libertação de ET (provavelmente

in healthy hearts moderate increases in afterload accelerate myocardial relaxation, while more marked increases, such as those arising from severe vasoconstriction, reduce relaxation velocity <sup>(126, 127)</sup>. This complex regulation of myocardial relaxation, involving opposing effects of ET-1, may explain why there are as yet no conclusive studies on the effects of this peptide on myocardial relaxation in the intact heart.

With regard to myocardial stiffness, various studies have suggested that chronically elevated levels of ET-1 in pathological conditions may increase diastolic stiffness by inducing myocardial hypertrophy and changes in the

ET-3), que activa o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . A estimulação deste trocador promove a elevação da concentração intracelular do  $\text{Na}^+$ , à qual se segue a activação do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  no modo reverso, conduzindo a um aumento da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e consequentemente da contractilidade miocárdica. A maior sensibilidade dos miofilamentos para o  $\text{Ca}^{2+}$  causada pela alcalinização intracelular resultante da activação do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  constitui uma via complementar da resposta lenta ao estiramento miocárdico<sup>(116-118)</sup> (Figura 4B). Piuhola e colaboradores<sup>(119)</sup> testaram a contribuição da ET-1 para o mecanismo de Frank-Starling em corações intactos de ratos saudáveis e hipertensos com hipertrofia miocárdica. Ambos, os corações saudáveis e os hipertróficos, apresentaram uma resposta de Frank-Starling preservada (ou seja, um aumento da função contrátil em resposta a um aumento da pré-carga/pressão telediastólica), contudo, enquanto que o bloqueio dos receptores da ET não teve qualquer efeito visível em corações saudáveis, atenuou significativamente a resposta de Frank-Starling nos corações hipertróficos. Estes resultados apontam para uma participação da ET-1 endógena na resposta a elevações da pré-carga na presença de hipertrofia miocárdica.

### Efeitos na Função Sistólica

Os determinantes da função diastólica incluem o relaxamento miocárdico e as propriedades passivas da parede ventricular, tais como a rigidez e a espessura da parede e a geometria da câmara (tamanho ou volume). Outros determinantes incluem as estruturas que rodeiam o ventrículo, a aurícula esquerda, as veias pulmonares e a válvula mitral, bem como a frequência cardíaca. Em relação à rigidez miocárdica, os seus determinantes estão relacionados com factores intrínsecos aos próprios cardiomiócitos (citoesqueleto) e com a matriz extracelular<sup>(120-122)</sup>. Neste contexto, a análise dos efeitos da ET-1 na função diastólica, deve ter em conta quer os efeitos no relaxamento miocárdico (efeitos lusitrópicos), quer os efeitos na rigidez miocárdica.

No que concerne ao relaxamento miocárdico, a administração exógena de ET-1 a preparações de músculo isolado resultou num aumento da velocidade de queda da tensão e de reextensão muscular (relaxamento miocárdico)<sup>(123)</sup>. No coração intacto, os efeitos da ET-1 podem resultar

extracelular matrix that lead to fibrosis<sup>(128, 129)</sup>. It has also been demonstrated in vitro in different cell types, including cardiomyocytes, that ET-1 can enhance the release of metalloproteases, and thus also possibly lead to fibrosis<sup>(130)</sup>.

On the other hand, there has been little study of the acute effects of ET-1 on myocardial stiffness, perhaps because the few researchers interested in the subject have concentrated on the effects of supraphysiological doses of exogenous ET-1 in the intact heart<sup>(124, 125, 131-134)</sup>. As stated above, in these circumstances ET-1 can cause severe coronary and systemic vasoconstriction, which may mask any effect of ET-1 on the intrinsic properties of the myocardium. In fact, both myocardial ischemia and markedly raised afterload can increase the end-diastolic pressure-volume relation, reflecting increased myocardial stiffness<sup>(127, 135-137)</sup>. However, studies in rabbit papillary muscle and human auricular trabeculae, in which such limitations are excluded, have shown that ET-1 increases distensibility of acutely loaded myocardium, with no impairment of contractile performance being observed<sup>(86)</sup>. This effect is mediated by  $\text{ET}_A$  receptors; it is dependent on the functional integrity of endocardial endothelium and modulated by endothelial  $\text{ET}_{B1}$  receptors, NO and prostaglandins<sup>(86, 138, 139)</sup>.

### Effects on cell growth and myocardial remodeling

Cardiac hypertrophy is an adaptation to pressure and volume overload and neurohumoral stimulation. Such adaptation may result in maintenance, improvement or impairment of cardiac function, depending on the type and degree of overload and on the mediators and intracellular signaling mechanisms involved. It was reported in the early 1990s that ET-1 can induce hypertrophy in cultured neonatal cardiomyocytes and fibroblasts<sup>(140, 141)</sup>. Subsequent studies showed that ET-1 acts in synergy with various growth factors to promote cell transformation and replication. It has nevertheless been difficult to establish a causal relationship between endogenous ET-1 and cardiac hypertrophy in vivo and in adult tissues<sup>(24)</sup>.

In experimental models of hypertrophy induced by pressure or volume overload, mechanical stress is probably the trigger for

da acção directa do peptídeo e de efeitos indirectos dependentes da vasoconstricção coronária e/ou sistémica. Enquanto que níveis moderados de vasoconstricção coronária não afectam significativamente a função cardíaca, efeitos vasoconstritores mais intensos induzidos por concentrações elevadas, não fisiológicas, de ET-1 induzem isquemia miocárdica<sup>(124,125)</sup>. Nesta situação há uma tendência para a diminuição da velocidade do relaxamento devida à falta de suprimento energético. Por outro lado, é sabido que, em corações saudáveis, aumentos moderados da pós-carga aceleram o relaxamento miocárdico, enquanto que aumentos mais severos, como os resultantes de vasoconstricção intensa, diminuem a velocidade de relaxamento<sup>(126,127)</sup>. Esta regulação complexa do relaxamento miocárdico associada aos potenciais efeitos opostos da ET-1 poderão explicar porque motivo não foram ainda conclusivos os estudos dos efeitos deste peptídeo sobre o relaxamento miocárdico no coração intacto.

Em relação à rigidez miocárdica, vários estudos sugerem que quando cronicamente elevada em condições patológicas, a ET-1 pode aumentar a rigidez diastólica através da indução de hipertrofia miocárdica e da alteração da matriz extracelular, conducentes à fibrose<sup>(128,129)</sup>. Não obstante, foi demonstrado em diferentes tipos de células *in vitro*, incluindo os cardiomiócitos, que a ET-1 pode também aumentar a libertação de metaloproteases, e assim talvez condicionar a fibrose<sup>(130)</sup>.

Por outro lado, o estudo dos efeitos agudos da ET-1 na rigidez miocárdica tem sido negligenciado, talvez devido ao facto dos poucos investigadores que se interessaram por este assunto, terem analisado os efeitos de doses suprafisiológicas de ET-1 exógena no coração intacto<sup>(124,125,131-134)</sup>. Como referido acima, nestas circunstâncias, a ET-1 pode provocar vasoconstricção coronária e sistémica intensa, o que pode mascarar qualquer efeito da ET-1 nas propriedades intrínsecas do miocárdio. De facto, ambas, isquemia miocárdica e elevações severas da pós-carga, são capazes de elevar a relação pressão-volume telediastólica, reflectindo um aumento na rigidez miocárdica<sup>(127,135-137)</sup>. Porém, estudos em músculos papilares de Coelho e em trabéculas auriculares humanas, em que estas limitações são excluídas, mostraram que a

gene transcription programs that include overexpression of ET-1<sup>(142)</sup>. Thus, in left ventricular cardiomyocytes of rats subjected to aortic constriction for several weeks, expression of prepro-ET-1 messenger RNA (mRNA) increased, suggesting that cardiomyocytes are a source of ET-1 production in hypertrophic hearts<sup>(143)</sup>. Treatment with a selective ET<sub>A</sub> receptor antagonist for two weeks prevented the development of hypertrophy in a similar experimental model<sup>(144)</sup>. However, overexpression of the ET system lasted only a few days following increase in pressure overload<sup>(144, 145)</sup>. In salt-sensitive hypertensive rats, ET was not activated in established hypertrophy but only in the transition to HF<sup>(146)</sup>.

Studies have also suggested that ET-1 is involved in right ventricular hypertrophy, based mainly on the overexpression of prepro-ET-1 documented in various animal models, including exposure to normobaric hypoxia, carbon monoxide, and monocrotaline<sup>(147, 148)</sup>. Furthermore, administration of selective ET<sub>A</sub> receptor antagonists to rats with monocrotaline-induced hypertension prevented development of right ventricular hypertrophy and fibrosis<sup>(149, 150)</sup>. Selective ET<sub>A</sub> and nonselective ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor antagonists also attenuated the cardiopulmonary alterations arising from experimentally induced right ventricular hypertrophy, leading to hemodynamic improvement and increased survival<sup>(151-155)</sup>.

Changes in the left ventricular myocardial genome and proteome of animals with pulmonary hypertension have been reported, even in the absence of overload<sup>(156, 157)</sup>, as has activation of neuroendocrine systems, particularly ET-1<sup>(158)</sup>. Interestingly, ET receptor blockade, both in vivo and in vitro, also reversed the left ventricular contractile dysfunction observed in this model<sup>(154, 158)</sup>.

To summarize, ET-1 formation appears to be temporarily stimulated as the heart adapts to a pathological increase in load, which suggests that the peptide may have an adaptive action. Various studies have indicated that ET-1 plays an important role as a hypertrophic agent in progression to HF, although the magnitude of its effects varies depending on the experimental model chosen.

ET-1-induced myocardial hypertrophy may result from activation of ET<sub>A</sub> receptors<sup>(149, 150)</sup>



ET-1 aumenta agudamente a distensibilidade miocárdica em situações de sobrecarga, sem que isso se traduza num comprometimento da função contráctil<sup>(86)</sup>. Este efeito é mediado pelos receptores ET<sub>A</sub>, dependente da integridade funcional do endotélio endocárdico e modulado pelos receptores ET<sub>B1</sub> endoteliais, pelo NO e pelas prostaglandinas<sup>(86,138,139)</sup>.

### Efeitos no Crescimento e Remodelagem Miocárdica

A hipertrofia cardíaca constitui um mecanismo de adaptação à sobrecarga de pressão e de volume e à estimulação neuro-humoral. Esta adaptação poderá resultar na manutenção, na melhoria ou na depressão da função cardíaca, dependendo do tipo e do grau de sobrecarga, bem como dos mediadores e dos mecanismos de sinalização intracelular envolvidos. No início dos anos 90, foi descrito que a ET-1 é capaz de induzir hipertrofia de cardiomiócitos e fibroblastos neonatais em cultura<sup>(140-141)</sup>. Trabalhos subsequentes mostraram que a ET-1 pode agir sinergicamente com vários factores de crescimento de forma a potenciar a transformação e a replicação celular. No entanto, torna-se difícil estabelecer uma relação causal entre a ET-1 endógena e a hipertrofia cardíaca *in vivo* e em tecidos adultos<sup>(24)</sup>.

Em modelos experimentais de hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão ou de volume, as forças biomecânicas são provavelmente o estímulo inicial dos programas de transcrição genética, incluindo a sobre-expressão de ET-1<sup>(142)</sup>. Assim, em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratos sujeitos a constrição aórtica durante várias semanas, a expressão de ARN mensageiro (ARNm) da pré-pró-ET-1 aumenta, sugerindo que os cardiomiócitos são uma fonte de produção de ET-1 em corações hipertróficos<sup>(143)</sup>. O tratamento com um antagonista selectivo para os receptores ET<sub>A</sub>, durante duas semanas, impediu o desenvolvimento de hipertrofia no mesmo modelo experimental<sup>(144)</sup>. No entanto, a sobre-expressão do sistema da ET, durou apenas alguns dias após o aumento da sobrecarga de pressão<sup>(144,145)</sup>. Em ratos com hipertensão sensível ao sal, este sistema não foi activado na fase de hipertrofia cardíaca estabelecida, mas apenas na transição para a IC<sup>(146)</sup>.

Alguns estudos sugerem, igualmente, um envolvimento da ET-1 na hipertrofia ventricular

and/or ET<sub>B</sub> receptors<sup>(159, 160)</sup>. The biochemical processes activated by the binding of ET-1 to its receptors involve PLC, PKC and various other kinases. PKC activates different MAPK isoforms, which phosphorylate and activate transcription factors such as c-fos and c-jun, leading to hypertrophic gene expression<sup>(102)</sup>.

### Role of endocardial and coronary vascular endothelium

Cardiac endothelial cells, endocardial and vascular, are the principal source of ET-1 in the healthy heart and cardiomyocytes are its main target, which makes this peptide an essential mediator in endothelial-myocardial interaction<sup>(1)</sup>. The effects of ET-1 are also modulated by the functional integrity of the endothelium.

The inotropic response to ET-1 is similar to the characteristic positive inotropic effect of cardiac endothelium<sup>(161-163)</sup>. The earlier onset of myocardial relaxation and reduced peak isometric tension observed after selective denudation of endocardial endothelium thus appear to be related to reduced endothelial release of ET-1<sup>(164-166)</sup>.

The inotropic action of ET-1 depends to a large extent on the type of experimental preparation used. For example, ET-1 is 60 times more potent in cardiomyocytes than in isolated papillary muscles<sup>(167)</sup>. The less potent physiological response in the multiple cell preparation may be due to a series of regulatory mechanisms involving other types of cell besides cardiomyocytes, such as cardiac endothelial cells. Li et al.<sup>(123)</sup> found that removing the endothelial cell layer from the endocardium increased myocardial sensitivity to ET-1 and altered the effects of this agent on twitch configuration characteristics. Another study demonstrated that brief exposure to a large number of reactive oxygen species, with partial destruction of the endothelial surface, induces an increase in papillary muscle contractile performance by stimulating release of ET-1 from endothelial cells<sup>(168)</sup>.

As mentioned above, there is disagreement on the physiological role of ET-1 in contractile function of the healthy heart *in vivo*, since on the one hand it increases oxygen consumption due to its potent inotropic effect, and on the other, it reduces oxygen supply due to its action as a coronary vasoconstrictor. It has been reported

direita, baseando-se sobretudo na sobre-expressão de pré-pró-ET-1 documentada em vários modelos animais, nomeadamente, de exposição à hipóxia normobárica, ao monóxido de carbono, à monocrotalina<sup>(147,148)</sup>. A acrescentar a estes resultados, a administração de antagonistas selectivos para os receptores ET<sub>A</sub> a ratos com hipertensão induzida pela monocrotalina evitou o desenvolvimento de hipertrofia e fibrose ventricular direita<sup>(149,150)</sup>. A utilização de inibidores selectivos para os receptores ET<sub>A</sub> e não-selectivos ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> atenuou também as alterações cardiopulmonares que sucedem à hipertrofia ventricular direita induzida experimentalmente, com melhoria hemodinâmica e aumento da sobrevivência<sup>(151-155)</sup>.

Apesar da ausência de sobrecarga, foram relatadas algumas alterações no genoma e proteoma do miocárdio ventricular esquerdo de animais com hipertensão arterial pulmonar<sup>(156,157)</sup>, bem como activação de sistemas neuro-endócrinos, designadamente do sistema da ET-1<sup>(158)</sup>. Curiosamente, o bloqueio dos receptores da ET quer *in vivo*, quer *in vitro*, reverteu também a disfunção contráctil do ventrículo esquerdo observada neste modelo<sup>(154,158)</sup>.

Em suma, a formação de ET-1 parece ser estimulada transitoriamente à medida que o coração se adapta ao aumento patológico da carga, o que sugere que este peptídeo poderá ter uma acção adaptativa. Diversos estudos apontam para um maior envolvimento da ET-1 como agente hipertrófico na progressão para a IC, embora a magnitude dos seus efeitos seja variável consoante o modelo experimental seleccionado.

Os processos hipertróficos miocárdicos induzidos pela ET-1 podem resultar da activação dos receptores ET<sub>A</sub><sup>(149,150)</sup>, e/ou dos receptores ET<sub>B</sub><sup>(159,160)</sup>. Os processos bioquímicos activados pela ligação da ET-1 aos seus receptores envolvem a activação da PLC, da PKC e de várias outras cinases. A PKC activa várias isoformas das MAPKs, que fosforilam e activam os factores de transcrição, tais como o *c-fos* e o *c-jun*, com consequente expressão de genes hipertróficos<sup>(102)</sup>.

### **Papel dos Endotélios Endocárdico e Vascular Coronário**

As células endoteliais cardíacas, endocárdicas e vasculares, são a principal fonte de ET-1 no coração saudável e os cardiomiócitos

however that *in vivo* ET-1 binds stoichiometrically to its receptor<sup>(169)</sup>. This characteristic may enable ET-1, secreted constitutively, to have an autocrine action by binding directly to ET<sub>B</sub> receptors on the endothelial surface, thus stimulating the secretion of NO and prostaglandins<sup>(36)</sup>, rather than increasing myocardial contractility by binding to the receptors in cardiomyocytes.

The effects of ET-1 on cardiac rhythmicity are even more complex and unpredictable (see above). In the healthy adult heart, ET-1 mRNA is expressed exclusively in endocardial and coronary vascular endothelial cells<sup>(162, 170)</sup>, while the mRNA of its receptors is expressed in both endothelial cells and cardiomyocytes, and, interestingly, also in the atrioventricular conduction system<sup>(95)</sup>. This distribution therefore suggests how the endothelium may modulate the effects of ET-1 on cardiac rhythm.

Increased ET-1 expression in endocardial and coronary artery endothelium has been confirmed in models of ventricular hypertrophy<sup>(171)</sup>. This increase appears to be sufficient to trigger the hypertrophic process in myocardial cells, irrespective of whether there is overexpression of ET-1<sup>(1)</sup>. As mentioned in the previous section, in a model of hypertension-induced hypertrophy, ventricular ET-1 levels were not elevated during the hypertrophic phase without HF<sup>(146)</sup>, which suggests there may be alternative pathways for adaptive myocardial growth. Increased myocardial ET-1 levels in the transition of left ventricular hypertrophy to HF and its association with deterioration of cardiac function<sup>(172)</sup> point to a role for ET-1 in maladapted myocardial remodeling.

### **EFFECTS ON PRENATAL DEVELOPMENT**

In 1994, Kurihara et al. first reported craniofacial abnormalities in mice with ET-1 gene deletion, thus highlighting the importance of this peptide in embryonic development<sup>(173)</sup>. Widening their study to the cardiovascular system, the authors documented gross defects in morphogenesis, manifested in a series of abnormalities of the aortic arch and aortic-pulmonary septation. Treating these animals with ET-1-specific antibodies or with selective

são o seu alvo prioritário, o que faz com que este peptídeo seja um mediador essencial na interacção endotélio-miocárdio<sup>(1)</sup>. Por outro lado, os efeitos da ET-1 são também modulados pela integridade funcional do endotélio.

A resposta inotrópica à ET-1 assemelha-se ao efeito inotrópico positivo característico do endotélio cardíaco<sup>(161-163)</sup>. O início precoce do relaxamento miocárdico e a redução do pico de tensão isométrica observados após destruição selectiva do endotélio endocárdico parecem assim estar relacionados com a menor libertação endotelial de ET-1<sup>(164-166)</sup>.

A acção inotrópica da ET-1 depende consideravelmente do tipo de preparação experimental utilizado. Por exemplo, a ET-1 é 60 vezes mais potente em cardiomiócitos do que em músculos papilares isolados<sup>(167)</sup>. A resposta fisiológica menos intensa nesta preparação multicelular poderá ser devida à existência de integração de uma série de mecanismos reguladores dependentes do envolvimento de outros tipos de células além dos cardiomiócitos, tais como as células endoteliais cardíacas. Li e colaboradores<sup>(123)</sup> verificaram que a remoção da camada de células endoteliais do endocárdio, aumenta a sensibilidade miocárdica à ET-1 e modifica as alterações induzidas por este agente na configuração do abalo muscular. Num outro estudo, foi demonstrado que a exposição breve a uma grande quantidade de espécies reactivas de oxigénio, com destruição parcial da superfície endotelial, induz um aumento da força de contracção de músculos papilares através da estimulação da libertação de ET-1 pelas células endoteliais<sup>(168)</sup>.

O papel fisiológico da ET-1 na função contráctil do coração saudável *in vivo* não é, como atrás foi mencionado, consensual, uma vez que, por um lado, aumenta o consumo de oxigénio em virtude do seu potente efeito inotrópico, e por outro, diminui o fornecimento do mesmo devido à sua acção como vasoconstritor coronário. Foi contudo descrito que *in vivo* a ET-1 se liga ao seu receptor estequiometricamente<sup>(169)</sup>. Esta característica poderá permitir que a ET-1, secretada constitutivamente, actue de forma autócrina ligando-se directamente aos receptores ET<sub>B</sub> na superfície endotelial, e assim estimule a secreção de NO e de prostaglandinas<sup>(36)</sup> em vez de promover aumento da contractilidade miocárdica pela ligação aos receptores presentes nos

ET<sub>A</sub> receptor antagonists increased the frequency and severity of these cardiovascular defects<sup>(174)</sup>. Other important effects of ET-1 include promotion of Purkinje fiber differentiation<sup>(175)</sup>, regulation of cardiac sympathetic innervation<sup>(176)</sup> and involvement in the formation of the cardiovascular outflow tract<sup>(177)</sup>.

cardiomiócitos.

As acções da ET-1 na ritmicidade cardíaca são ainda mais complexas e imprevisíveis (*vide supra*). No coração adulto e saudável, o ARNm da ET-1 é expresso, exclusivamente, nas células endoteliais endocárdicas e vasculares coronárias <sup>(162,170)</sup>, enquanto que o ARNm dos seus receptores é expresso, quer nas células endoteliais, quer nos cardiomiócitos, e curiosamente, também no sistema de condução aurículo-ventricular <sup>(95)</sup>. Esta distribuição prediz, portanto, a potencial modulação dos efeitos da ET-1 sobre o ritmo cardíaco pelo endotélio.

O aumento da expressão de ET-1 nas células endoteliais endocárdicas e coronárias está comprovado em modelos de hipertrofia ventricular <sup>(171)</sup>. Este aumento parece ser suficiente para desencadear o processo hipertrófico na células miocárdicas, independentemente de nestas existir, ou não, sobre-expressão de ET-1 <sup>(1)</sup>. Como referido na secção anterior, num modelo de hipertrofia dependente de hipertensão, os níveis ventriculares de ET-1 não se encontravam aumentados durante a fase hipertrófica sem IC <sup>(146)</sup>, o que sugere a existência de vias alternativas para o crescimento miocárdico adaptativo. O aumento de níveis miocárdicos de ET-1 na transição da hipertrofia ventricular esquerda para a IC e a sua associação com a deterioração da função cardíaca <sup>(172)</sup> indiciam uma acção da ET-1 na remodelagem miocárdica desadaptada.

## EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL

Em 1994, Kurihara e colaboradores relataram, pela primeira vez, defeitos craniofaciais em Ratinhos com deleção do gene da ET-1, chamando então a atenção para a relevância deste peptídeo no desenvolvimento embrionário <sup>(173)</sup>. Alargando estes estudos para o sistema cardiovascular, estes autores documentaram defeitos grosseiros na morfogénese, manifestados por uma série de anomalias do arco aórtico e da septação aórtico-pulmonar. O tratamento destes animais com anticorpos específicos para a ET-1 ou com antagonistas selectivos para os receptores ET<sub>A</sub> aumentou a frequência e a extensão destes defeitos cardiovasculares <sup>(174)</sup>. Efeitos adicionais proeminentes da ET-1 incluem a promoção da diferenciação das fibras de Purkinje <sup>(175)</sup>, a regulação da inervação cardíaca simpática <sup>(176)</sup> e a participação na formação do tracto de saída cardíaco <sup>(177)</sup>.

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

CARMEN BRÁS-SILVA

Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina do Porto

Al. Prof. Hernâni Monteiro

4200-319 Porto

Tel. +351 22 5513644 Fax +351 22 5513646

E-mail: carmensb@med.up.pt

## BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev* 2003; 83: 59-115.
2. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
3. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985; 248: C550-C556.
4. Gillespie MN, Owasojo JO, McMurtry IF, O'Brien RF. Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 236: 339-343.
5. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415.
6. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2863-2867.
7. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 1989; 264: 14954-14959.
8. Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem* 1989; 264: 14613-14616.
9. Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics* 1991; 10: 236-42.

10. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 730-732.
11. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 732-735.
12. Vanhoutte PM. Endothelin-1 - a matter of life and breath. *Nature* 1994; 368: 693-694.
13. Ihara M, Ishikawa K, Fukuroda T et al. In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ETA receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20: S11-S14.
14. Clozel M, Breu V, Burri K et al. Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* 1993; 365: 759-761.
15. Clozel M, Breu V, Gray GA et al. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270: 228-235.
16. Schmidt M, Kroger B, Jacob E et al. Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett* 1994; 356: 238-243.
17. Shimada K, Takahashi M, Tanzawa K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 18275-18278.
18. Xu D, Emoto N, Gaiad A et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; 78: 473-485.
19. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 1995; 270: 15262-15268.
20. Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000; 102: 2434-2440.
21. D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 503-510.
22. Davenport AP, Maguire JJ. Endothelin. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 176: 295-329.
23. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 424-430.
24. Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 508-531.
25. Neylon CB, Hoyland J, Mason WT, Irvine RF. Spatial dynamics of intracellular calcium in agonist-stimulated vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1990; 259: C675-C686.
26. Battistini B, D'Orleans-Juste P, Sirois P. Endothelins - circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 1993; 68: 600-628.
27. Wagner OF, Christ G, Wojta J et al. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 16066-16068.
28. Brunner F. Tissue endothelin-1 levels in perfused rat heart following stimulation with agonists and in ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1953-1963.
29. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993; 268: 19126-19133.
30. Lecoin L, Sakurai T, Ngo MT, Abe Y, Yanagisawa M, Le Douarin NM. Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3024-3029.
31. Davenport AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on Endothelin Receptor Nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 219-226.
32. Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 103-108.
33. Shraga-Levine Z, Sokolovsky M. Functional coupling of G proteins to endothelin receptors is ligand and receptor subtype specific. *Cell Mol Neurobiol* 2000; 20: 305-317.
34. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 391-415.
35. Tsukahara H, Ende H, Magazine HI, Bahou WF, Goligorsky MS. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269: 21778-21785.
36. De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 9797-9800.
37. Mallat A, Fouassier L, Preaux AM et al. Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway. *J Clin Invest* 1995; 96: 42-49.
38. Okazawa M, Shiraki T, Ninomiya H, Kobayashi S, Masaki T. Endothelin-induced apoptosis of A375 human melanoma cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 12584-12592.
39. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1461-1465.
40. Honore JC, Fecteau MH, Brochu I, Labonte J, Bkaily G, D'Orleans-Juste P. Concomitant antagonism of endothelial and vascular smooth muscle cell-ETB receptors for endothelin induces hypertension in the hamster. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1258-H1264.
41. Ozaki S, Ohwaki K, Ihara M, Fukuroda T, Ishikawa K, Yano M. ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 483-489.
42. Sudjarwo SA, Hori M, Tanaka T, Matsuda Y, Okada T, Karaki H. Subtypes of endothelin ETA and ETB receptors mediating venous smooth muscle contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 627-633.
43. Douglas SA, Meek TD, Ohlstein EH. Novel receptor antagonists welcome a new era in endothelin biology. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 313-316.
44. Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. Inotropic effects of ETB receptor stimulation and their modulation by endocardial endothelium, NO, and prostaglandins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1194-H1199.



45. Clozel M, Gray GA. Are there different ETB receptors mediating constriction and relaxation? *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: S262-S264.
46. Fukuroda T, Ozaki S, Ihara M et al. Necessity of dual blockade of endothelin ETA and ETB receptor subtypes for antagonism of endothelin-1-induced contraction in human bronchi. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 995-999.
47. Mickley EJ, Gray GA, Webb DJ. Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 1376-1382.
48. Himeno A, Shigematsu K, Taguchi T, Niwa M. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: interaction in the recognition of endothelin-1 between ETA and ETB receptors. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18: 447-452.
49. Zuccarello M, Boccaletti R, Rapoport RM. Endothelin ET(B1) receptor-mediated relaxation of rabbit basilar artery. *Eur J Pharmacol* 1998; 357: 67-71.
50. Adner M, Shankley N, Edvinsson L. Evidence that ET-1, but not ET-3 and S6b, ET(A)-receptor mediated contractions in isolated rat mesenteric arteries are modulated by co-activation of ET(B) receptors. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 927-935.
51. Harada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K, Niwa M. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol* 2002; 22: 207-226.
52. Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G et al. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* 2004; 279: 27679-27687.
53. Gregan B, Schaefer M, Rosenthal W, Oksche A. Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44: S30-S33.
54. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 1996; 81: 1510-1515.
55. Dupuis J, Schwab AJ, Simard A, Cernacek P, Stewart DJ, Goresky CA. Kinetics of endothelin-1 binding in the dog liver microcirculation in vivo. *Am J Physiol* 1999; 277: G905-G914.
56. Johnstrom P, Fryer TD, Richards HK, Harris NG, Barret O, Clark JC. Positron emission tomography using 18F-labelled endothelin-1 reveals prevention of binding to cardiac receptors owing to tissue-specific clearance by ETB receptors in vivo. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 115-122.
57. Vijayaraghavan J, Scicli AG, Carretero OA, Slaughter C, Moomaw C, Hersch LB. The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *J Biol Chem* 1990; 265: 14150-14155.
58. Turner AJ, Tanzawa K. Mammalian membrane metalloproteases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J* 1997; 11: 355-364.
59. Abe Y, Nakayama K, Yamanaka A, Sakurai T, Goto K. Subtype-specific trafficking of endothelin receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 8664-8671.
60. Bremnes T, Paasche JD, Mehluum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 17596-17604.
61. Oksche A, Boese G, Horstmeyer A et al. Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 1104-1113.
62. Yamaguchi T, Murata Y, Fujiyoshi Y, Doi T. Regulated interaction of endothelin B receptor with caveolin-1. *Eur J Biochem* 2003; 270: 1816-1827.
63. Boivin B, Villeneuve LR, Farhat N, Chevalier D, Allen BG. Sub-cellular distribution of endothelin signaling pathway components in ventricular myocytes and heart: lack of preformed caveolar signalosomes. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 665-676.
64. Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 235-255.
65. Sato K, Oka M, Hasunuma K, Ohnishi M, Sato K, Kira S. Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs. *Am J Physiol* 1995; 269: L668-L672.
66. Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, Wharton J. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 398-405.
67. Moreland S, McMullen DM, Delaney CL, Lee VG, Hunt JT. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184: 100-106.
68. Bacon CR, Davenport AP. Endothelin receptors in human coronary artery and aorta. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 986-992.
69. Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascu Pharmacol* 2005; 43: 19-29.
70. Warner TD. Relationships between the endothelin and nitric oxide pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 247-252.
71. Alonso D, Radomski MW. The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail Rev* 2003; 8: 107-115.
72. Jougasaki M, Schirger JA, Simari RD, Burnett JC Jr. Autocrine role for the endothelin-B receptor in the secretion of adrenomedullin. *Hypertension* 1998; 32: 917-922.
73. Dschietzig T, Bartsch C, Richter C, Laule M, Baumann G, Stangl K. Relaxin, a pregnancy hormone, is a functional endothelin-1 antagonist - Attenuation of endothelin-1-mediated vasoconstriction by stimulation of endothelin type-B receptor expression via ERK-1/2 and nuclear factor-kB. *Circ Res* 2003; 92: 32-40.
74. Wiley KE, Davenport AP. Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 1146-1152.
75. Nakashima M, Vanhoutte PM. Endothelin-1 and -3 cause endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am J Physiol* 1993; 265: H2137-H2141.
76. Yoshida K, Yasujima M, Kohzuki M, Kanazawa M, Yoshinaga K, Abe K. Endothelin-1 augments pressor response to angiotensin II infusion in rats. *Hypertension* 1992; 20: 292-297.
77. Yang ZH, Richard V, von Segesser L et al. Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. A new mechanism of vasospasm? *Circulation* 1990; 82: 188-195.
78. Marini M, Carpi S, Bellini A, Patalano F, Mattoli S. Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 896-899.

79. Hafizi S, Allen SP, Goodwin AT, Chester AH, Yacoub MH. Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis* 1999; 146: 351-359.
80. Xu SW, Howat SL, Renzoni EA et al. Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK. *J Biol Chem* 2004; 279: 23098-23103.
81. Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET(A) receptors and platelet-activating factor. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 969-979.
82. Weissberg PL, Witchell C, Davenport AP, Hesketh TR, Metcalfe JC. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1990; 85: 257-262.
83. Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension* 1998; 32: 89-95.
84. Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 Suppl 3: S2-13.
85. Takanashi M, Endoh M. Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1991; 261: H611-H619.
86. Leite-Moreira AF, Brás-Silva C, Pedrosa CA, Rocha-Sousa AA. ET-1 increases distensibility of acutely loaded myocardium: a novel ETA and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-mediated effect. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H1332-H1339.
87. Wang J, Paik G, Morgan JP. Endothelin 1 enhances myofilament Ca<sup>2+</sup> responsiveness in aequorin-loaded ferret myocardium. *Circ Res* 1991; 69: 582-589.
88. Meyer M, Lehnart S, Pieske B et al. Influence of endothelin-1 on human atrial myocardium-myocardial function and subcellular pathways. *Basic Res Cardiol* 1996; 91: 86-93.
89. Baydoun AR, Peers S, Cirino G, Woodward B. Effects of endothelin-1 on the rat isolated heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13: S193-S196.
90. Pieske B, Beyersmann B, Breu V et al. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation* 1999; 99: 1802-1809.
91. MacCarthy PA, Grocott-Mason R, Prendergast BD, Shah AM. Contrasting inotropic effects of endogenous endothelin in the normal and failing human heart - Studies with an intracoronary ETA receptor antagonist. *Circulation* 2000; 101: 142-147.
92. Izumi M, Miyamoto S, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Negative inotropic effect of endothelin-1 in the mouse right ventricle. *Eur J Pharmacol* 2000; 396: 109-117.
93. Zhu Y, Yang HT, Endoh M. Negative chronotropic and inotropic effects of endothelin iso-peptides in mammalian cardiac muscle. *Am J Physiol* 1997; 42: H119-H127.
94. Chu L, Takahashi R, Norota I et al. Signal transduction and Ca<sup>2+</sup> signaling in contractile regulation induced by crosstalk between endothelin-1 and norepinephrine in dog ventricular myocardium. *Circ Res* 2003; 92: 1024-1032.
95. Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A et al. Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 1993; 72: 526-538.
96. Kelso EJ, McDermott BJ, Silke B, Spiers JP. Endothelin A receptor subtype mediates endothelin-induced contractility in left ventricular cardiomyocytes isolated from rabbit myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 1047-1052.
97. Beyer ME, Slesak G, Hoffmeister HM. Significance of endothelin B receptors for myocardial contractility and myocardial energy metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 1228-1234.
98. Beyer ME, Slesak G, Hovelborn T, Kazmaier S, Nerz S, Hoffmeister HM. Inotropic effects of endothelin-1 - Interaction with molsidomine and with BQ 610. *Hypertension* 1999; 33: 145-152.
99. Piihola J, Mäkinen M, Szokody I, Ruskoaho H. Dual role of endothelin-1 via ETA and ETB receptors in regulation of cardiac contractile function in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H112-H118.
100. Burrell KM, Molenaar P, Dawson PJ, Kaumann AJ. Contractile and arrhythmic effects of endothelin receptor agonists in human heart in vitro: blockade with SB 209670. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 449-459.
101. Brás-Silva C, Fontes-Sousa A, Moura C, Areias JC, Leite-Moreira AF. Impaired response to ETB receptor stimulation in heart failure. Functional evidence of endocardial endothelial dysfunction? *Exp Biol Med* 2006; 231: 893-898.
102. Sugden PH. An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 871-886.
103. Kramer BK, Smith TW, Kelly RA. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na<sup>+</sup>(+)-H<sup>+</sup> exchanger. *Circ Res* 1991; 68: 269-279.
104. Katoh H, Terada H, Imuro M et al. Heterogeneity and underlying mechanism for inotropic action of endothelin-1 in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 1343-1350.
105. Woo SH, Lee CO. Effects of endothelin-1 on Ca<sup>2+</sup> signaling in guinea-pig ventricular myocytes: role of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 631-643.
106. Ponick K, Vogelsang M, Heinroth M et al. Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation* 1998; 97: 744-751.
107. Dhein S, Giessler C, Wangemann T, Silber RE, Zerkowski HR, Brodde OE. Differential pattern of endothelin-1-induced inotropic effects in right atria and left ventricles of the human heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 564-569.
108. Garjani A, Wainwright CL, Zeitlin IJ, Wilson C, Slee SJ. Effects of endothelin-1 and the ETA-receptor antagonist, BQ123, on ischemic arrhythmias in anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25: 634-642.
109. Sharif I, Kane KA, Wainwright CL. Endothelin and ischaemic arrhythmias - antiarrhythmic or arrhythmogenic? *Cardiovasc Res* 1998; 39: 625-632.
110. Brunner F, Opie LH. Role of endothelin-A receptors in ischemic contracture and reperfusion injury. *Circulation* 1998; 97: 391-398.
111. Tanaka H, Habuchi Y, Yamamoto T, Nishio M, Morikawa J, Yoshimura M. Negative chronotropic actions of endothelin-1 on rabbit sinoatrial node pacemaker cells. *Br J Pharmacol*

- 1997; 122: 321-329.
112. Ono K, Tsujimoto G, Sakamoto A et al. Endothelin-A receptor mediates cardiac inhibition by regulating calcium and potassium currents. *Nature* 1994; 370: 301-304.
113. Kim D. Endothelin activation of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in atrial cells. *Circ Res* 1991; 69: 250-255.
114. James AF, Xie LH, Fujitani Y, Hayashi S, Horie M. Inhibition of the cardiac protein kinase A-dependent chloride conductance by endothelin-1. *Nature* 1994; 370: 297-300.
115. Parmley WW, Chuck L. Length-dependent changes in myocardial contractile state. *Am J Physiol* 1973; 224: 1195-1199.
116. Cingolani HE, Perez NG, Aiello EA, de Hurtado MC. Intracellular signaling following myocardial stretch: an autocrine/paracrine loop. *Regul Pept* 2005; 128: 211-220.
117. Perez NG, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE. Reverse mode of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange after myocardial stretch - Underlying mechanism of the slow force response. *Circ Res* 2001; 88: 376-382.
118. Ennis IL, Garcarena CD, Pérez NG, Dulce RA, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. Endothelin isoforms and the response to myocardial stretch. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2925-H2930.
119. Piuhola J, Szokodi I, Kinnunen P et al. Endothelin-1 contributes to the Frank-Starling response in hypertrophic rat hearts. *Hypertension* 2003; 41: 93-98.
120. Gillebert TC, Leite-Moreira AF, De Hert SG. Load dependent diastolic dysfunction in heart failure. *Heart Failure Rev* 2000; 5: 345-355.
121. Kass DA, Bronzwaer JG, Paulus WJ. What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure? *Circ Res* 2004; 94: 1533-1542.
122. Leite-Moreira AF. Current perspectives in diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Heart* 2006; 92: 712-718.
123. Li K, Stewart DJ, Rouleau JL. Myocardial contractile actions of endothelin-1 in rat and rabbit papillary muscles. *Circ Res* 1991; 69: 301-312.
124. Ezra D, Goldstein RE, Czaja JF, Feuerstein GZ. Lethal ischemia due to intracoronary endothelin in pigs. *Am J Physiol* 1989; 257: H339-H343.
125. Karwatowska-Prokopeczuk E, Wennmalm A. Effects of endothelin on coronary flow, mechanical performance, oxygen uptake, and formation of purines and on outflow of prostacyclin in the isolated rabbit heart. *Circ Res* 1990; 66: 46-54.
126. Leite-Moreira AF, Gillebert TC. Nonuniform course of left ventricular pressure fall and its regulation by load and contractile state. *Circulation* 1994; 90: 2481-2491.
127. Leite-Moreira AF, Correia-Pinto J, Gillebert TC. Afterload induced changes in myocardial relaxation: A mechanism for diastolic relaxation. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 344-353.
128. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 657-687.
129. Clozel M, Salloukh H. Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan. *Ann Med* 2005; 37: 2-12.
130. Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC Jr. Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev* 2004; 9: 53-61.
131. Clozel JP, Clozel M. Effects of endothelin on the coronary vascular beds in open chest dogs. *Circ Res* 1989; 65: 1193-1200.
132. Hom GJ, Touhey B, Rubanyi GM. Effects of intracoronary administration of endothelin in anesthetized dogs: comparison with Bay k 8644 and U 48619. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19: 194-200.
133. Khandoudi N, Ho J, Karmazyn M. Role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in mediating effects of endothelin-1 on normal and ischemic/reperfused hearts. *Circ Res* 1994; 75: 369-378.
134. Offstad J, Tonnessen T, Kirkeboen KA, Ilebekk A, Downing SE. Modulation of systolic and diastolic function by endothelin-1: relation to coronary flow. *Acta Physiol Scand* 1995; 154: 103-111.
135. Grossman W, Barry WH. Diastolic pressure-volume relations in the diseased heart. *Fed Proc* 1980; 39: 148-155.
136. Paulus WJ, Grossmann W, Serizawa T, Bourdillon PD, Pasipoularides A, Mirsky I. Different effects of two types of ischemia on myocardial systolic and diastolic function. *Am J Physiol* 1985; 248: H719-H728.
137. Leite-Moreira AF, Correia-Pinto J. Load as an acute determinant of end-diastolic pressure-volume relation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H51-H59.
138. Brás-Silva C, Leite-Moreira AF. Obligatory role of the endocardial endothelium in the increase of myocardial distensibility induced by endothelin-1. *Exp Biol Med* 2006; 231: 876-881.
139. Brás-Silva C, Monteiro-Sousa D, Duarte AJ et al. Nitric oxide and prostaglandins – important players in endothelin-1 induced myocardial distensibility. *Physiol Res* 2007 May 30; (Epub ahead of print).
140. Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN et al. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1990; 265: 20555-20562.
141. Ito H. Endothelins and cardiac hypertrophy. *Life Sci* 1997; 61: 585-593.
142. Ruwhof C, van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 23-37.
143. Arai M, Yoguchi A, Iso T et al. Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 1995; 268: H2084-H2091.
144. Ito H, Hiroe M, Hirata Y et al. Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation* 1994; 89: 2198-2203.
145. Schunkert H, Orzechowski HD, Bocker W, Meier R, Riegger GA, Paul M. The cardiac endothelin system in established pressure overload left ventricular hypertrophy. *J Mol Med* 1999; 77: 623-630.
146. Iwanaga Y, Kihara Y, Hasegawa K, Inagaki K, Yoneda T, Kaburagi S, Araki M, Sasayama S. Cardiac endothelin-1 plays a critical role in the functional deterioration of left ventricles during the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in salt-sensitive hypertensive rats. *Circulation* 1998; 98: 2065-2073.
147. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary

- alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993; 73: 887-897.
148. Brown LA, Nunez DJ, Brookes CI, Wilkins MR. Selective increase in endothelin-1 and endothelin A receptor subtype in the hypertrophied myocardium of the aorto-venacaval fistula rat. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 768-774.
149. Ichikawa KI, Hidai C, Okuda C et al. Endogenous endothelin-1 mediates cardiac hypertrophy and switching of myosin heavy chain gene expression in rat ventricular myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1286-1291.
150. Brunner F, Wolkart G, Haleen S. Defective intracellular calcium handling in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy: protective effect of long-term endothelin-A receptor blockade with 2-benzo[1,3]dioxol-5-yl-3-benzyl-4-(4-methoxy-phenyl)-4-oxobut-2-enoate-sodium (PD155080). *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 442-449.
151. Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Dicarlo VS, Oparil S. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1995; 79: 2122-2131.
152. Eddahibi S, Raffestin B, Clozel M, Levame M, Adnot S. Protection from pulmonary hypertension with an orally active endothelin receptor antagonist in hypoxic rats. *Am J Physiol* 1995; 268: H828-H835.
153. Hill NS, Warburton RR, Pietras L, Klinger JR. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1997; 83: 1209-1215.
154. Jasmin JF, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 103: 314-318.
155. Yuyama H, Fujimori A, Sanagi M et al. The orally active nonpeptide selective endothelin ETA receptor antagonist YM598 prevents and reverses the development of pulmonary hypertension in monocrotaline-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 496: 129-139.
156. Sharma S, Taegtmeyer H, Adroque J et al. Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1185-H1192.
157. Schott P, Singer SS, Kogler H et al. Pressure overload and neurohumoral activation differentially affect the myocardial proteome. *Proteomics* 2005; 5: 1372-1381.
158. Lourenço AP, Roncon-Albuquerque Jr R, Brás-Silva C et al. Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in the left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H1587-H1594.
159. Cullen JP, Bell D, Kelso EJ, McDermott BJ. Use of A-192621 to provide evidence for involvement of endothelin ETB-receptors in endothelin-1-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *Eur J Pharmacol* 2001; 417: 157-168.
160. Lee GR, Bell D, Kelso EJ, Argent CC, McDermott BJ. for altered ETB receptor characteristics during development and progression of ventricular cardiomyocyte hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H425-H432.
161. Wang J, Morgan JP. Endothelin reverses the effects of acidosis on the intracellular Ca<sup>2+</sup> transient and contractility in ferret myocardium. *Circ Res* 1992; 71: 631-639.
162. Mebazaa A, Wetzel R, Cherian M, Abraham M. Comparison between endocardial and great vessel endothelial cells: morphology, growth, and prostaglandin release. *Am J Physiol* 1995; 268: H250-H259.
163. Prendergast BD, Anning PB, Lewis MJ, Shah AM. Regulation of left ventricular relaxation in the isolated guinea-pig heart by endogenous endothelin. *Cardiovasc Res* 1997; 33: 131-138.
164. Brutsaert DL, Meulemans AL, Sipido KR, Sys SU. Effects of damaging the endocardial surface on the mechanical performance of isolated cardiac muscle. *Circ Res* 1988; 62: 358-366.
165. Evans HG, Lewis MJ, Shah AM. Modulation of myocardial relaxation by basal release of endothelin from endocardial endothelium. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1694-1699.
166. Shah AM. Decreased myocardial contractility after damage to endocardial endothelium is caused mainly by loss of endothelin production. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 644-645.
167. Talukder MA, Norota I, Sakurai K, Endoh M. Inotropic response of rabbit ventricular myocytes to endothelin-1: difference from isolated papillary muscles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H596-H605.
168. De Keulenaer GW, Andries LJ, Sys SU, Brutsaert DL. Endothelin-mediated positive inotropic effect induced by reactive oxygen species in isolated cardiac muscle. *Circ Res* 1995; 76: 878-884.
169. Frelin C, Guedin D. Why are circulating concentrations of endothelin-1 so low? *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1613-1622.
170. Nishimura T, Yamada H, Kinoshita M, Ochi J. Endothelin expression during rat heart development: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Biomed Res* 1994; 15: 291-298.
171. Lariviere R, Deng LY, Day R, Sventek P, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2123-2131.
172. Morimoto T, Hasegawa K, Kaburagi S et al. Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 13721-13726.
173. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*. 1994; 368: 703-710.
174. Kurihara Y, Kurihara H, Oda H et al. Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J Clin Invest*. 1995; 96: 293-300.
175. Kanzawa N, Poma CP, Takebayashi-Suzuki K, Diaz KG, Layliev J, Mikawa T. Competency of embryonic cardiomyocytes to undergo Purkinje fiber differentiation is regulated by endothelin receptor expression. *Development* 2002; 129: 3185-3194.
176. Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y et al. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest*. 2004; 113: 876-884.
177. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA et al. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development*. 1998; 125: 813-824.



# 21<sup>as</sup> Jornadas de Cardiologia do Hospital Egas Moniz

Hotel Vila Galé Ópera, Lisboa, 16 e 17 de Outubro de 2008

## Cardiologia 2008 Para o Clínico Prático

### 16 DE OUTUBRO 2008, 5<sup>a</sup> FEIRA

**09:00 Abertura do Secretariado**

**09:15 Abertura das Jornadas**

**09:30-10:30 TRÊS CASOS CLÍNICOS PRÁTICOS**

*Nuno Vasconcelos (CHLO-HEM) e  
Pimenta da Graça (CHLO-HEM)*

- **Jovem com palpitações e sopro na ponta**  
*José Monteiro (CHLO-HEM)*
- **40 anos, fibrilhação auricular, episódio sincopal**  
*Madalena Barata (C.S. Loures)*
- **Dor torácica em doente portador de stent**  
*Carvalho Rodrigues (CHLO-HEM)*

**Comentários:** *José Alves (CHLO-HEM) e  
Alberto Indeuque (CHLO-HEM)*

**10:30-11:00 DISPIDÉMIAS E INFLAMAÇÃO**

**O QUE APRENDEMOS NOS ÚLTIMOS ANOS?**  
*Presidente: Miguel Mendes (CHLO-HEM)*  
*- Alberto Mello e Silva (CHLO-HEM)*

**11:00-11:45 Café / Visita Exposição Técnica**

**11:45-12:30 ANGIOTAC DAS CORONÁRIAS - PARA QUEM?**

*Presidente: Aniceto Silva (CHLO-HSC)*  
*- Pedro Sousa (CHLO-HSC)*  
*- Pedro Gonçalves (CHLO-HSC)*

**12:30-13:15 ESTENOSE VALVULAR AÓRTICA DO IDOSO - 2008**

*Presidente: José Pinto Carmona (CHLO-HEM)*

- **Será possível contrariar a história natural?**  
*Paulo Amado (CHLO-HEM)*
- **Avanços na Intervenção**  
*J. Queiroz e Melo (CHLO-HSC)*

**13:15-15:00 Almoço**

**15:00-15:30 PONTO DA SITUAÇÃO - OS INIBIDORES DA RENINA**

*José Nazaré (CHLO-HEM)*

**15:30-16:45 2008 - O QUE HÁ DE NOVO EM CARDIOLOGIA?**

**PERGUNTAS E RESPOSTAS:**  
*Presidentes: Manuel Carrageta (HGO), Pedro Canas (HSM)*

**Perguntas:**

- Rui Pombal (UCS/TAP)
- Joana Campina (C. S. Ajuda)
- Fátima Cruz (C. S. Sto Condestável)
- Luís Bimbo (C. S. Borba)

**Respostas:**

- Nuno Lousada (HPV) sobre insuficiência cardíaca
- José Miguel Santos (CHLO-HSFX) sobre arritmologia
- Carlos Aguiar (CHLO-HSC) sobre cardiopatia isquémica
- Machado Saraiva (CHLO-HEM) sobre diabetes mellitus

**16:45-17:45 MESA REDONDA**

**CARDIOPNEUMOLOGIA / ENFERMAGEM CARDIOLÓGICA**

*M<sup>a</sup> Jesus Serrador (CHLO-HEM)*  
*Rosário Pinheiro (CHLO-HEM)*

### 17 DE OUTUBRO 2008, 6<sup>a</sup> FEIRA

**O DOENTE HIPERTENSO ENTRE AS ÚLTIMAS GUIDELINES EUROPEIAS E OS PROGRESSOS RECENTES**

**09:30-10:00 AS MENSAGENS-CHAVE DAS GUIDELINES 2007**

*Presidente: António Jara (H. Espírito-Santo, Évora)*  
*- Teresa Rodrigues (H. Santarém)*

**10:00-10:30 O QUE ESTÁ A MUDAR NA DOENÇA CARDIOVASCULAR EM PORTUGAL?**

*Luís Martins (H. S. Sebastião, Feira)*

**10:30-11:15 Café / Visita Exposição Técnica / Sorteio do Prémio Delta**

**11:15-13:00 HTA - RISCO GLOBAL - OS GRANDES ESTUDOS 2007/2008**

**CINCO INTERVENÇÕES BREVES**  
*Presidente: Agostinho Monteiro (HSJ)*  
*João Saavedra (HSM)*

**O benefício e o custo dos exames na avaliação do risco**

*José Braz Nogueira (HSM)*

**O doente diabético hipertenso**

*J. Alberto Silva (HPH)*

**Diminuir o risco cardiovascular no hipertenso muito idoso**

*José Nazaré (CHLO-HEM)*

**Nova evidência da importância da terapêutica vasodilatadora**

*J. Pinto Carmona (CHLO-HEM)*

**IECAs ou ARAs?**

*Jorge Polónia (CHLO-HEM)*

**Comentador:** *João Maldonado (IIFCV)*